

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie der Robert-Rössle
Klinik
der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Bedeutung des Knochenmark-
mikromilieus für Wachstum und
Medikamentenresistenz des Multiplen
Myeloms unter besonderer Berücksichtigung
von Interleukin-6**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Dirk Hönemann
aus Braunschweig

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. R. C. Bargou
2. Prof. Dr. med. H. Einsele
3. Prof. Dr. W. Wels

Datum der Promotion: 26.09.2005

Abstract

Das Knochenmarkmikromilieu produziert eine Reihe von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren, die für das maligne Wachstum und die Medikamentenresistenz von Myelomzellen von grosser Bedeutung sind. Einer der wichtigsten Faktoren, der in manchen experimentellen Systemen sogar als essentiell für das Wachstum und Überleben von Myelomzellen beschrieben wurde, ist Interleukin-6. Aus diesem Grund könnte die Entwicklung von Substanzen, die die Wirkung von Il-6 oder dem IL-6 Rezeptor inhibieren von Bedeutung für die Therapie des Myeloms sein. In dieser Arbeit wurde die Wirkung des IL-6 Rezeptorantagonisten SANT7 auf das Überleben der IL-6 abhängigen Myelomzelllinie INA-6 sowie primären Myelomzellen in Gegenwart oder Abwesenheit von primären humanen Knochenmarkstromazellen (KMSZ) untersucht. Von besonderem Interesse war hierbei die Frage ob SANT7 die wachstumshemmende Wirkung von Dexamethson (Dex) und All-Trans-Retinolsäure (ATRA) verstärken kann. Keine der drei Substanzen, SANT7 eingeschlossen, konnte bei alleiniger Applikation in Gegenwart von primären humanen KMSZ eine nennenswerte Wachstumshemmung induzieren. Wenn jedoch Dex und ATRA mit SANT7 kombiniert wurden konnte sowohl in INA-6 als auch primären Myelomzellen eine starke Wachstumshemmung erzielt werden. Dieser Effekt beruht sowohl auf Apoptose als auch eines Zellzyklusarrests.

Schlagwörter:

Multiples Myelom

Interleukin-6

SANT7

Mikromilieu

Apoptose

Abstract

The bone marrow microenvironment produces a number of different survival factors that are important for the malignant growth and drug resistance of multiple myeloma (MM) cells. One of the main factors reported to be essential for survival and growth of MM cells in some experimental systems is interleukin-6 (IL-6). Therefore, the development and testing of substances that interfere with IL-6 or IL-6 receptor (IL-6R) function might have a potential therapeutic value for the treatment of multiple myeloma. In this work the effect of the IL-6 receptor antagonist SANT7 on growth and survival of the IL-6 dependent MM cell lines INA-6 as well as primary MM cells in the presence or absence of bone marrow stromal cells (BMSC) was analyzed. Of particular interest was the question whether SANT7 might enhance the growth inhibitory effects of dexamethasone (Dex) and all-trans retinoic acid (ATRA). None of the drugs, when tested as a single substance, including SANT7, induced major growth inhibition if MM cells were co-cultured with primary human BMSCs. However, if Dex and ATRA were given in combination with SANT7 a strong growth inhibition was achieved in INA-6 and primary MM cells. This effect is due to cell cycle arrest and induction of apoptosis.

Keywords:

Multiple Myeloma

Interleukin-6

SANT7

Microenvironment

Apoptosis

Widmung

Meiner Familie

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinen beiden Betreuern PD Dr. med. Ralf Bargou und Dr. rer. nat. Kurt Bommert, die mich in die Wissenschaft eingeführt haben. Ihre grosse Hilfsbereitschaft, ständige Diskussionsbereitschaft und fachliche Kompetenz gepaart mit grösstem Engagement waren für das Zustandekommen dieser Arbeit und aller daraus hervorgegangenen Projekte unersetzlich.

Dank gilt auch Prof. Dr. med. Bernd Dörken für stets kritische und deshalb wertvolle Diskussionen.

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei allen Kollegen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dörken am MDC für eine sehr gute Zusammenarbeit in ausgesprochen angenehmer menschlicher Atmosphäre bedanken. Besonders erwähnen möchte ich hier Manik Chatterjee, der mit seinem Engagement grossen Anteil am Erfolg der Projekte zum Thema „Multiples Myelom“ hat.

Dank gilt auch allen Kollegen ausserhalb der eigenen Arbeitsgruppe, die mir in Gesprächen, Kursen und Diskussionen geholfen haben meinen Horizont zu erweitern.

Ausserhalb des Arbeitslebens gilt mein grösster Dank selbstverständlich meinen Eltern, deren ständige und bedingungslose Unterstützung Grundlage für die Erfüllung meines Berufswunsches war.

Darüberhinaus möchte ich mich natürlich auch bei meiner Frau Gabriele für die grosse Liebe, Geduld und Hilfe in allen Lebenslagen bedanken. Ohne dass er es schon verstehen könnte gilt mein Dank auch meinem kleinen Sohn Finn, der für mich eine Quelle grosser Freude und Energie ist.

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei meinem Bruder Jens bedanken, der mir bei meinen ersten Schritten nach und in Berlin „Asyl“ gewährt hat und auch sonst ständig hilfsbereit ist, ein „grosser Bruder“ eben.

1.	EINLEITUNG	9
1.1.	DAS MULTIPLE MYELOM – KLINIK UND BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN	9
1.1.1.	<i>Klinik</i>	9
1.1.2.	<i>Die Biologie der normalen und malignen Plasmazelle</i>	12
1.1.3.	<i>Die Entstehung des multiplen Myeloms – ein Mehrstufenprozeß?</i>	15
1.1.4.	<i>Interleukin-6 als Wachstumsfaktor für das Multiple Myelom</i>	19
1.2.	KNOCHENMARKSTROMAZELLEN ALS ZELLULÄRE VEHIKEL	23
1.2.1.	<i>Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von KMSZ</i>	23
1.2.2.	<i>„Homing“ von KMSZ</i>	24
1.2.3.	<i>KMSZ als Zielzellen für die somatische Gentherapie</i>	25
1.3.	GRUNDLAGEN DES RETROVIRALEN GENTRANSFERS	26
1.3.1.	<i>Aufbau und Lebenszyklus von Retroviren</i>	26
1.3.2.	<i>Rekombinante Retroviren</i>	27
1.3.3.	<i>Sicherheitsaspekte</i>	28
2.	ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	30
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	32
3.1.	KLONIERUNG DER SANT7 C-DNA.....	32
3.2.	BAKTERIELLE EXPRESSION DES SANT7MH PROTEINS.....	35
3.3.	ZELLEN UND MEDIEN	36
3.4.	NACHWEIS DER STAT 3 PHOSPHORYLIERUNG DURCH WESTERN BLOTTING	36
3.5.	HERSTELLUNG RETROVIRALER VEKTOREN UND STABILER VERPACKUNGSZELLINIEN.....	37
3.6.	TRANSDUKTION VON ZIELZELLEN	38
3.7.	ANREICHERUNG TRANSDUZierter ZELLEN DURCH IMMUNOMAGNETISCHE BEADS	38
3.8.	EXPRESSIONSNACHWEIS DURCH DURCHFLUSSZYTOMETRIE	38
3.9.	EXPRESSIONSNACHWEIS DURCH RT-PCR	38
3.10.	PROLIFERATIONSASSAYS IL-6 ABHÄNGIGER MYELOMZELLEN	39
3.11.	KULTUR DER MYELOMZELLEN IN GEGENWART VON KMSZ.....	39
3.12.	MESSUNG VON APOPTOSE BZW. ZELLVIABILITÄT MIT DER ANNEXIN V/PROPIDIOMJODID (PI) METHODE 40	
3.13.	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ZELLYKLUSANALYSE	40
3.14.	INTERLEUKIN-6 BESTIMMUNG IN KOKULTUREN MIT ELISA	40
3.15.	AUFREINIGUNG PRIMÄRER MYELOMZELLEN.....	41
4.	ERGEBNISSE	43
4.1.	WACHSTUM, ÜBERLEBEN UND MEDIKAMENTENRESISTENZ VON MYELOMZELLEN IN ABWESENHEIT UND GEGENWART VON KNOCHENMARKSTROMAZELLEN	43
4.1.1.	<i>Herstellung von rekombinantem SANT7mH, Wirkung auf INA-6 Zellen in Gegenwart von exogenem rekombinantem IL-6</i>	43

4.1.2.	<i>Wirkung von SANT7mH auf INA-6 in Gegenwart der humanen Stromazelllinie HS-5</i>	50
4.1.3.	<i>Wirkung von SANT7mH auf INA-6 in Gegenwart von primären KMSZ</i>	52
4.1.4.	<i>Wirkung von SANT7mH auf primäre Myelomzellen in Gegenwart von primären KMSZ</i>	54
4.1.5.	<i>Beeinflussung der Medikamentenresistenz von kokultivierten Myelomzellen durch SANT7</i>	55
4.2.	IL-6 REZEPTORBLOCKADE ALS GENTHERAPEUTISCHES KONZEPT UNTER ANWENDUNG EINES EINES RETROVIRALEN GENTRANSFERSYSTEMS IN KNOCHENMARKSTROMAZELLEN.	61
4.2.1.	<i>Transduktion der humanen Stromazelllinie HS-5 mit dem MgSLS7mH Vektor</i>	61
4.2.2.	<i>Überleben von INA-6 Zellen auf transduzierten HS-5</i>	65
5.	DISKUSSION	67
6.	ZUSAMMENFASSUNG	75
7.	LITERATUR	78

1. Einleitung

1.1. Das Multiple Myelom – Klinik und biologische Grundlagen

1.1.1. Klinik

Das Multiple Myelom (Syn. Plasmozytom, M. Kahler) ist eine hauptsächlich auf das Knochenmark beschränkte maligne Erkrankung der terminal differenzierten B Zelle bzw. antikörperproduzierenden Plasmazelle. Mit einer Inzidenz von ca. 3-4 Neuerkrankungen/100.000/Jahr ist es eine der häufigsten hämatologischen Neoplasien und der häufigste maligne Knochtumor. Herausragende ätiologische Faktoren sind nicht bekannt, Schwarze sind jedoch etwa doppelt so häufig betroffen wie Kaukasier. Der Altersgipfel des Multiplen Myeloms liegt bei etwa 65 Jahren, es kann aber auch junge Menschen betreffen.

Nach Diagnosestellung erfolgt die Stadieneinteilung in drei Stadien nach Salmon und Durie (siehe Tabelle 1.1.1). Das mittlere Überleben nach Erreichen eines klinisch manifesten Stadiums (II und III) liegt unbehandelt bei ca. 4 – 11 Monaten [1].

Tabelle 1.1.1: Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms nach Salmon und Durie. Für ein Stadium I müssen alle dort genannten Kriterien erfüllt sein. Bereits ein genanntes Kriterium genügt dagegen zur Einstufung in Stadium III. Eine zusätzliche Einteilung in A und B erfolgt nach Abwesenheit (A) bzw. Vorhandensein (B) einer Niereninsuffizienz ab einem Kreatininspiegel > 2 mg/dl.

Stadium	Kriterien
I	Hb > 10 g/dl Korrigiertes Calcium normal IgG < 5 g/dl IgA < 3 g/dl Leichtketten im Urin < 4g/24h Maximal eine solitäre Knochenläsion
II	Weder I noch II
III	Hb < 8,5 g/dl Korrigiertes Calcium erhöht IgG > 7 g/dl IgA > 5 g/dl Leichtketten im Urin > 12g/24h Multiple Knochenläsionen

Die Hauptkomplikationen des Plasmozytoms lassen sich aus der Biologie der Erkrankung ableiten: die Lokalisation im Knochenmark führt, v.a. zytokinvermittelt, zur Osteoklastenaktivierung mit resultierenden Knochendestruktionen. Hierdurch kommt es vermehrt zu schmerzhaften Osteolysen und nachfolgend pathologischen Frakturen, oft auch im Bereich der Wirbelsäule mit nachfolgendem Querschnittssyndrom [2]. Nicht selten haben Myelompatienten aufgrund der Knochenbeteiligung vor der korrekten Diagnosestellung viele orthopädische oder physiotherapeutische Therapieversuche hinter sich. Die Krankheitslokalisation im Knochenmark führt über die lokale Knochendestruktion hinaus auch zu einer Beeinträchtigung der normalen Hämatopoese, initial v.a. mit Anämie und in fortgeschrittenen Stadien auch Panzytopenie. Darüberhinaus besteht häufig ein sogenannter relativer Immunglobulinmangel, d.h. es sind trotz großer Mengen monoklonalen Immunglobulins (Hypergammaglobulinämie), welches von den malignen Plasmazellen produziert wird, nur noch wenige funktionelle Antikörper vorhanden. Dies führt nachfolgend zu einer Neigung zu hauptsächlich bakteriellen Infekten.

Die Häufigkeit des Auftretens der unterschiedlichen Immunglobulinisotypen

beim Multiplen Myelom repräsentiert letztlich die Verteilung der einzelnen Isotypen bei gesunden Plasmazellen: IgG macht ca. 60% aller Myelome aus, gefolgt von IgA mit ca. 25%. IgD, IgE und IgM bilden zusammen nur ca. 1 - 5% aller Myelome. Darüberhinaus gibt es selten asekretorische Myelome (1 – 5%), die in der Verlaufskontrolle der Erkrankung grosse Probleme bereiten können, da die Immunglobulinproduktion als messbarer Tumorparameter ausfällt. Mit ca. 15% dagegen recht häufig sind reine Leichtkettenproduzenten (kappa häufiger als lambda im Verhältnis von ca. 2 : 1). Da isolierte Leichtketten aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichtes (20 – 25 kD) glomerulär frei filtriert werden, ist bei hoher Leichtkettenausscheidung häufig eine progrediente Nierenschädigung die Folge. Diese ist so charakteristisch, dass sie als Myelomniere bezeichnet wird und die letztlich zur terminalen Niereninsuffizienz führt. Infekte und Niereninsuffizienz sind schlussendlich die Haupttodesursachen bei Myelompatienten.

Die definitive Diagnosestellung erfolgt nach wie vor durch die morphologische Begutachtung einer Knochenmarksbiopsie. Erhöhte Werte der Gammaglobuline im peripheren Blut mit einem monoklonalen Gipfel können wegweisend sein, treten jedoch auch bei anderen Erkrankungen auf. Weiterhin charakteristisch sind osteolytische Knochenläsionen v.a. des Achsenskeletts und des Schädels im konventionellen Röntgenbild. Zur Übersicht über die Klinik siehe [1].

Als unabhängige prognostische Faktoren gelten das Krankheitsstadium, die Zytogenetik (v.a. eine mögliche Deletion des Chromosom 13), der sogenannte Plasmazell-Labeling Index zur Bestimmung der Wachstumsfraktion der Myelomzellen, sowie folgende Laborparameter: beta-2 Mikroglobulin, CRP, LDH, Kreatinin und Hämoglobin [3].

Die Therapie besteht im Wesentlichen aus der Chemotherapie, wobei MP (Melphalan/Prednisolon) und VAD (Vincristin, Doxorubicin, Dexamethason) die wichtigsten konventionellen Schemata sind. Ca. 50 – 70% der Patienten sprechen auf diese Therapien an und im Falle eines Ansprechens verlängert sich das mittlere Überleben auf ca. 36 Monate. Komplette Remissionen, d.h. eine negative Immunfixation als sensitive Nachweismethode, werden allerdings nur von ca. 5% der Patienten erreicht, die mit konventioneller Chemotherapie behandelt werden [4]. Demgegenüber gehört das multiple Myelom zu den wenigen Erkrankungen, für die ein klarer Überlebensvorteil nach hochdosierter Chemotherapie mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation gegenüber konventioneller Chemotherapie gezeigt wurde, sodass diese Therapie derzeit als Standard zu betrachten ist. Hier können ca. 40% komplette Remissionen beobachtet werden. Diese verbesserte Rate an kompletten Remissionen spiegelt sich auch in einem verlängerten medianen Überleben von ca. 5 Jahren wieder [5, 6]. Allerdings zeichnet sich derzeitiger Datenlage ab, dass die überwiegende Anzahl der Patienten

auch nach Hochdosistherapie wieder rezidiert. Aus diesem Grund ist die sogenannte „Tandem-Hochdosistherapie“, d.h. eine zweimalige Hochdosistherapie innerhalb von ca. 3 Monaten Gegenstand laufender klinischer Untersuchungen. Diese Therapien werden im allgemeinen gut vertragen, die allogene Stammzelltransplantation dagegen ist nach wie vor trotz Anwendung sogenannter Mini-Protokolle mit einer exzessiven therapieassoziierten Mortalität (25 – 40%) behaftet und kommt nur für wenige junge Patienten in sehr gutem Allgemeinzustand in Frage [7, 8]. Über die zytoreduktive Chemotherapie hinaus haben Supportivtherapien v.a. in der Reduktion der Morbidität des Myeloms erhebliche Bedeutung. So werden lokale Komplikationen durch Weichteilmanifestationen überwiegend strahlentherapeutisch behandelt, stabilitätsgefährdende Osteolysen sind demgegenüber eine Domäne der Neurochirurgie und Orthopädie. In den neunziger Jahren haben die Bisphosphonate darüberhinaus eine wichtige Rolle in der Prophylaxe und Therapie der Knochendestruktionen erlangt. So konnte in einer grossen Phase III Studie durch i.v. Pamidronat das Auftreten von skelettassoziierten Ereignissen (pathologische Frakturen, Notwendigkeit von Strahlentherapie oder Operationen und Auftreten einer Spinalkanalkompression) um 42% vermindert werden [9]. In-vitro Ergebnisse lassen sogar auf eine anti-Tumoraktivität dieser Substanzen schliessen, wenngleich ein Überlebensvorteil durch Anwendung von Bisphosphonaten nicht gezeigt ist [2]. Gegenwärtig wird überprüft ob im nach derzeitigem Standard nicht therapiepflichtigen Stadium I der Erkrankung eine Bisphosphonattherapie vorteilhaft ist.

In jüngster Zeit wurde mit Thalidomid eine Substanz identifiziert, die bei ca. einem Drittel therapierefraktärer Myelompatienten noch Wirkung zeigt [10]. Grosse Phase III Studien, die einen Überlebensvorteil durch Thalidomid zeigen fehlen bis jetzt noch. In mehreren Phase I/II Studien werden darüberhinaus gegenwärtig verschiedenste Substanzen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit beim Myelom untersucht, so z.B. Thalidomidderivate [11], Arsentrioxid [12] und Proteasominhibitoren [13]. Eine detaillierte Übersicht über die Therapie des Multiplen Myeloms sowie prognostische Faktoren findet sich bei Barlogie et al [4].

1.1.2. Die Biologie der normalen und malignen Plasmazelle

1.1.2.1. Die Biologie der normalen Plasmazelle

Durch die Produktion von Antikörpern spielen Plasmazellen eine wichtige Rolle in der akuten Infektabwehr, beim Schutz gegen wiederkehrende Infektionen und bei der Vermittlung eines

langfristigen Impfschutzes [14]. Andererseits tragen Antikörper oft auch zur Ätiopathologie vieler Autoimmunerkrankungen und Allergien bei. Trotz der Bedeutung von Plasmazellen in Immunologie, Rheumatologie und Hämatologie sind die Mechanismen der terminalen B Zellentwicklung noch verhältnismässig wenig verstanden.

Der mit Abstand größte Anteil der Immunglobuline im Serum vom IgG- und IgA-Typ wird von einer kleinen Anzahl von sogenannten langlebigen Plasmazellen im Knochenmark produziert. Die tägliche Immunglobulinproduktion dieser Zellen liegt zum Teil über 1 ng pro Zelle. Diese terminal-differenzierte B Zelle teilt sich nicht mehr und zeigt mit der Expression von CD38 und Syndecan-1 einen charakteristischen Immunphänotyp (Abb. 1.1.2.1), der von früheren B Zellstadien deutlich abweicht. Die Vorläuferzelle der Plasmazelle ist der langsam proliferierende Plasmablast, der nach Antigenstimulation aus dem Keimzentrum eines Lymphfollikels in das Knochenmark wandert.

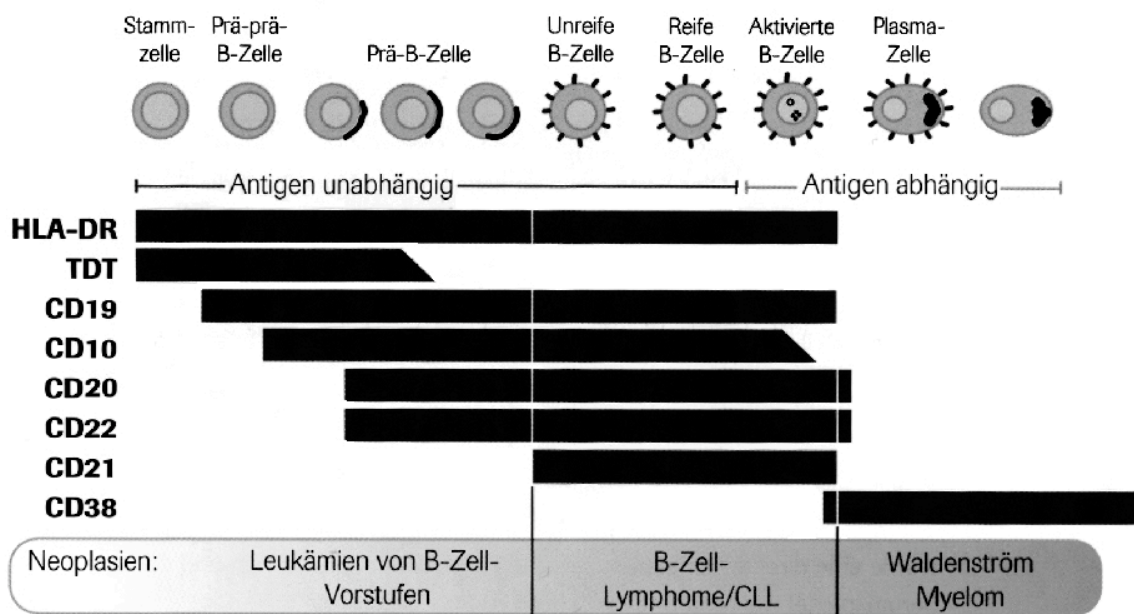


Abb. 1.1.2.1: Stadien der B Zellentwicklung

Die frühe B Zelldifferenzierung beginnt bei Reifungsstufen, die der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark nachfolgen. Während der Differenzierungsphase im Knochenmark entstehen durch funktionelles Rearrangement der Immunglobulingene sogenannte "Virgin"-B-Zellen, B Zellen, die schließlich als reife Zellen das Knochenmak verlassen. Trifft eine solche B Zelle, welche Oberflächen Ig als Antigen-Rezeptoren exprimiert, in der Peripherie zum ¹³erstenmal auf ihr "passendes" Antigen, kommt

es zur Aktivierung und klonalen Expansion. Im Falle von Proteinantigenen wird diese Aktivierung durch weitere Signale von T-Helferzellen vermittelt. Zunächst entsteht der Lymphoblast, der drei mögliche Differenzierungswege vor sich hat: ein Teil der Zellen wird zu kurzlebigen Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen, die innerhalb von drei Tagen absterben; ein weiterer Teil differenziert zu Gedächtniszellen und ein dritter Teil wandert in das Keimzentrum von Lymphfollikeln. Dort durchlaufen die B Zellen den sogenannten Isotyp-”Switch” (d.h. sie stellen ihre Produktion von IgM auf IgG, IgD oder IgA um) sowie die sogenannte somatische Hypermutation ihrer Immunglobulingene. Die Art der T Zell-Hilfe bestimmt hierbei die produzierte Antikörperklasse und ob sich die aktivierte B-Zelle zu einer Gedächtniszelle oder einer Plasmazelle entwickelt. Durch Antigenbindung und ein dadurch induziertes Aktivierungssignal werden die am besten passenden Klone positiv selektioniert. B Zellen mit unproduktiven Ig-Rearrangements, die nicht zu einer Oberflächen-Expression von Immunglobulinen führen, und klonale Varianten, die nicht zu einer optimalen Antigenbindung fähig sind, sterben durch programmierten Zelltod (Apoptose) ab. Die so entstandenen Plasmablasten wandern dann wieder ins Knochenmark. Dort hört der Plasmablast auf zu proliferieren und differenziert unter dem Einfluß von durch Adhäsionsmolekülen vermittelten Signalen und Interleukin-6 zur langlebigen Plasmazelle. Diese Plasmazelle stirbt nach etwa 30 Tagen durch Apoptose ab. Die molekularen Grundlagen für die Entstehung und das Überleben von kurzlebigen und langlebigen Plasmazellen sind bis heute weitgehend unklar. Zur Übersicht siehe [15].

1.1.2.2. Die Biologie der malignen Plasmazelle

Maligne Plasmazellen sind wie benigne Plasmazellen in enger Assoziation mit Stromazellen überwiegend im Knochenmark zu finden, extramedulläre Lokalisationen sind selten. Maligne Plasmazellen sind langlebige Zellen mit einem in der Regel sehr niedrigen ”Labeling-index” (LI 1%-2%). Die rearrangierten Immunglobulingene sind hypermutiert ohne Hinweis darauf, daß der Prozess der Hypermutation während des Krankheitsverlaufs weitergeht [16]. Man nimmt daher an, daß die Plasmazytomzelle das korrespondierende maligne Gegenstück zu der im Knochenmark lokalisierten langlebigen (benignen) Plasmazelle ist [17]. Allerdings zeigen Myelomzellen in der Regel Charakteristika unreifer Zellen und ähneln morphologisch häufig Plasmablasten. Im Gegensatz zu normalen Plasmazellen produzieren Myelomzellen vergleichsweise geringe Mengen an Immunglobulinen und sind in der Mehrzahl der Fälle CD56-positiv und CD19-negativ, exprimieren aber wie die normale Plasmazelle CD38, und Syndecan-

1 [1]. Myelomzellen sind in fast allen Fällen aneuploid (meistens hyperdiploid) [18], man findet häufig numerische und strukturelle chromosomale Aberrationen meist auf den Chromosomen 13 und 14 [19, 20]. Diese genetischen Aberrationen verhindern möglicherweise den normalen Zelltod (Apoptose) und führen zur Deregulation der Zellzykluskontrolle der Myelomzelle, die auf diese Weise weiter proliferiert und im Knochenmark akkumuliert.

Die spezifischen somatischen Mutationen der Immunglobulingene mit dem entsprechenden resultierenden Idiotyp unterscheiden den malignen Plasmazellklon von anderen B-Zell-Klonen [1, 16, 17]. Die Stabilität der Mutationen und der Idiotypexpression kann unmittelbare klinische Bedeutung erlangen: mittels PCR-Technik kann z.B. nach Chemotherapie eine minimale Resterkrankung nachgewiesen werden, was in Zukunft für die Einschätzung des Therapieerfolges und die weitere Therapieplanung von Bedeutung sein könnte und gegenwärtig in Studien untersucht wird. Die sogenannte Idiotyp-Vakzinierung mit monoklonalem Immunglobulin stellt darüberhinaus eine neuartige Immuntherapiestrategie dar [21, 22].

1.1.3. Die Entstehung des multiplen Myeloms – ein Mehrstufenprozeß?

1.1.3.1. Monoklonale Gammopathie (MGUS)

Die "Monoklonale Gammopathie ungewisser Signifikanz" (MGUS) ist durch das Vorliegen von monoklonalem Immunglobulin im Serum und das Fehlen sonstiger für das Multiple Myelom typischer Diagnosekriterien gekennzeichnet. So findet man beim MGUS ein konstant niedriges monoklonales Immunglobulin (<3g/dl), keine Verminderung der physiologischen Immunglobuline, keine wesentliche Bence-Jones-Proteinurie, normale Hämoglobin- und Kalziumwerte, eine nur geringgradige Plasmazellvermehrung (<10%) im Knochenmark, keine Osteolysen und keine extramedullären Herde. In der Mehrzahl der Fälle verläuft das MGUS gutartig, in etwa 7% der Fälle geht ein MGUS in ein Multiples Myelom, einen M. Waldenström, ein Plasmozytom oder eine primäre Amyloidose über. Der einzige bekannte Risikofaktor für eine solche Krankheitsprogression ist die initiale Serumkonzentration des monoklonalen Ig Proteins [23]. Obwohl umgekehrt die Häufigkeit der Myelome, die aus einem MGUS hervorgehen, unbekannt ist, geht man zur Zeit von der sogenannten "Two-hit"- bzw. "Multistep"- Hypothese der Entstehung des Multiplen Myeloms aus. Die bereits in den 70-er Jahren entwickelte "Two-hit" Hypothese postuliert ein erstes onkogenes Ereignis, das zu einer monoklonalen Gammopathie führt, und einen zweiten Schritt, der schließlich zum Multiplen Myelom führt ([1,

17, 24], Abbildung 1.1.3.4).

1.1.3.2. Genetische Veränderungen

Entsprechend der Mehrstufenhypothese finden sich bereits beim MGUS in etwa der Hälfte der Fälle genetische Veränderungen wie Aneuploidie, Trisomien, sowie der Monosomie 13 [25, 26, 27]. In über 90% der Fälle findet man genetische Veränderungen beim Multiplen Myelom (11). In 60 - 65% der Fälle mit intramedullärem Myelom sind Translokationen mit regelmäßiger Beteiligung der "Switch"-Region des IgH (Schwerketten)-Locus auf Chromosom 14 (q32) nachweisbar [20]. Es wird vermutet, daß in der Pathogenese des Plasmazytoms die 14q32 Translokation ein frühes onkogenes Ereignis darstellt, welches während des Differenzierungsvorgangs der Isotyp-"Switch" Rekombination geschieht, das nicht-produktive Immunglobulin-Allel betrifft und dem MGUS vorausgeht [17].

Die IgH Translokation (14q32) führt zur deregulierten Expression von Proto-Onkogenen entsprechender Partnerchromosomen. Es wurden viele verschiedene Partnerchromosomen und Onkogene beschrieben, die bei 14q32-Translokationen involviert sind, wobei 4 Translokationspartner die Mehrzahl (ca. 50%) der primären IgH Translokationen ausmachen. In 15 - 20% der Fälle ist der chromosomale Partnerlokus 11q13 (bcl-1/Cyclin D1), in 15% 4p16.3 (FGFR3), in 5 - 10% 16q23 (c-maf), in weiteren 5% 6p21 (Cyclin D3) [20]. Die Überexpression der entsprechenden Translokationspartner konnte in Mikroarrays dokumentiert werden [28]. Demgegenüber finden sich in ca. 15% der Patienten komplexe 8q24 (c-myc) Translokationen, die eher spätere Ereignisse in der malignen Transformation darstellen [29]. Eine Reihe weiterer unterschiedlicher Partnerloci sind noch nicht näher charakterisiert.

Translokationen mit Beteiligung des bcl-1 Locus (11q13) und des IgH Locus (14q32) finden sich neben dem Multiplen Myelom gehäuft auch bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) und in mehr als 80% der Fälle mit Mantelzell-Lymphomen. Allerdings liegt der Bruchpunkt beim Multiplen Myelom (sowohl auf Chromosom 11 als auch auf 14) an einer anderen Stelle als bei Mantelzell-Lymphomen [30, 31]. Die t(11;14) Translokation kann zur Überexpression von Cyclin D1 führen [31]. Cyclin D1 bildet zusammen mit CDK4 (cyclin-dependent kinase) eine aktive Kinase, die das Retinoblastomgenprodukt (pRB) phosphoryliert und inaktiviert; dieser Vorgang erlaubt die Progression durch die G1 Phase des Zellzyklus [32]. Man kann daher vermuten, daß die t(11;14) Translokation zur Überexpression von Cyclin D1 und zur Deregulation von Zellzyklusvorgängen führt und somit entscheidend zur Immortalisierung der Plasmazelle beitragen könnte.

Die t(4;14)(q13;q32) Translokation bei Myelomzellen führt zur deregulierten Expression von FGFR-3 (fibroblast growth factor receptor 3) [33]. Diese neu entdeckte Translokation wurde bisher nur bei Myelomzellen gefunden und ist daher möglicherweise spezifisch für das Myelom. Es wird vermutet, daß die Myelomzelle durch den Wachstumsfaktor FGF (fibroblast growth factor) ein ständiges FGFR-3-vermitteltes Proliferations- und Überlebenssignal erhält, der von den Stromazellen des Knochenmark synthetisiert wird. Es ist daher vorstellbar, daß die durch die t(4;14) Translokation verursachte FGFR-3 Überexpression ein frühes Ereignis ist, das (in ähnlicher Weise wie die Cyclin D1-Überexpression, siehe oben) zur Immortalisierung und MGUSEntstehung beitragen könnte [33, 34].

In ca. 15% der Myelomfälle ist eine t(8;14) Translokation nachweisbar, die den Locus des Proto-Onkogens c-myc betrifft. Dennoch findet sich in der Mehrzahl der Myelomfälle eine c-myc Überexpression[35]. Ursache hierfür sind unter anderem Genamplifikation oder Mutationen im 5'-nicht-translatierten Bereich des c-myc-Gens, die zur Deregulation der Translationskontrolle der c-myc Expression führen [36]. Weiterhin kann c-myc durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren im Rahmen des Tumormikromilieus (siehe 1.1.4 und 1.2) aktiviert werden. C-myc spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Abgesehen von wenigen Fällen mit t(8;14) Tranlokationen, bei denen der c-myc Locus primär involviert ist, ist der Zeitpunkt der c-myc Deregulation bei den meisten Myelomfällen unklar. Möglicherweise stellt in den meisten Fällen die c-myc Deregulation bereits ein späteres Ereignis und den zweiten "Hit" bei der Myelomenstehung dar. Es ist vorstellbar, daß die Überexpression von c-myc in der bereits immortalisierten MGUS-Zelle zur malignen Transformation beiträgt [29].

Eine Sonderstellung unter den genetischen Veränderungen nimmt die Deletion des Chromosoms 13 ein. Diese wird in ca. 20% der MGUS und 30 - 40% der Myelompatienten gefunden und ist mit einer deutlich verschlechterten Prognose assoziiert [27, 37].

1.1.3.3. Ras-Mutationen und p53

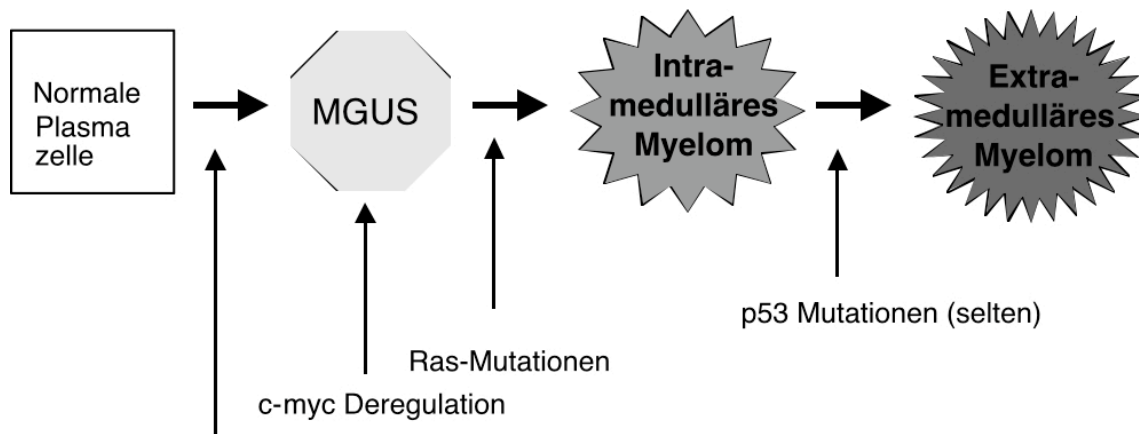
Die Proteine H-Ras, K-Ras und N-Ras werden durch das humane ras Gen kodiert und sind Membran-assoziierte GTPasen. Sie sind den Rezeptor-Tyrosinkinasen und weiteren Nicht-Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen nachgeschaltet und sind Mediatoren unterschiedlicher biologischer Wachstums- und Differenzierungssignale. Die Häufigkeit von ras-Mutationen beim Multiplen Myelom steigt parallel zum Erkrankungsstadium an. So finden sich bei solitären Plasmozytomen und beim MGUS praktisch keine ras-Mutationen [38]. Bei intramedullären

Multiplen Myelomen werden Mutationen dagegen in bis zu 30% der Fälle nachgewiesen; in terminalen Stadien der Erkrankung und bei Plasmazelleukämien finden sich Mutationen in bis zu 70% der Fälle[1, 17, 39]. Man nimmt daher an, daß ras-Mutationen zu den späteren "Second Hit" Ereignissen gehören, die zur malignen Transformation der MGUS-Zelle zur Myelomzelle führen, d.h. entscheidend zur weiteren Krankheitsprogression beitragen.

Das Tumorsuppressor-Gen p53 ist ein zentraler Regulator von Zellzyklus und Apoptose. Entsprechend kommen p53-Mutationen bei einer Vielzahl maligner Tumoren zu einem hohen Prozentsatz der Fälle vor. Beim Multiplen Myelom sind p53-Mutationen eher selten[40]. Allerdings finden sich bei (den eher seltenen) Fällen von Plasmazelleukämie in bis zu 40% der Fälle Mutationen; bei Myelom-Zelllinien sind p53 Mutationen ebenfalls häufig (zur Übersicht siehe [17]). P53 Mutationen scheinen somit in der Krankheitsentwicklung eher spät aufzutreten und sind mit aggressiven extramedullären Myelomstadien assoziiert [1, 17].

1.1.3.4. Das Mehrstufen-Modell der Myelompathogenese

Zusammenfassend läßt sich für die Entstehung des Multiplen Myeloms folgendes Mehrstufen-Modell entwerfen, das zum jetzigen Zeitpunkt in Teilen noch spekulativ ist: Obwohl nicht bei jedem Patienten jedes einzelne Stadium klinisch immer sicher unterscheidbar ist, verläuft der Entstehungsprozess des Multiplen Myeloms wahrscheinlich in mehreren Schritten ausgehend von der normalen Plasmazelle über MGUS bis schließlich zum Multiplen Myelom. In seltenen Fällen schreitet die Erkrankung bis zum extramedullär manifesten Myelom fort. In Fällen völlig dedifferenzierter Myelomzellen lassen sich schließlich Zelllinien etablieren, die *in vitro* propagiert werden können. Die 14q32 Translokation ist wahrscheinlich ein frühes Ereignis ("First hit"). Diese Translokation führt zur deregulierten Expression von Onkogenen (z.B. Cyclin D1, FGFR-3 u.a.) und tritt wahrscheinlich zeitgleich mit dem Differenzierungsschritt der Idiotyp "Switch"-Rekombination auf. Dies führt zur Entstehung der MGUS-Zelle, die bereits immortalisiert aber noch nicht maligne transformiert ist und somit noch kein progressives Wachstum zeigt und keine Knochendestruktionen verursachen kann. Ein späteres Ereignis ("Second hit") führt zur Transformation vom MGUS zum intramedullären Multiplen Myelom, das auf das Knochenmark- "Microenvironment" begrenzt ist, progressives Wachstum zeigt und zu Osteolysen führt. Verantwortlich für diesen zweiten "Hit" sind möglicherweise genetische Veränderungen im c-myc Locus und/oder ras-Mutationen. P53-Mutationen sind sehr späte und eher seltene Ereignisse, die mit den eher seltenen extramedullären Manifestationsformen des Multiplen Myeloms assoziiert sind (Abb. 1.1.3.4).



t (4;14) FGFR-3
t (11;14) Cyclin D1
andere 14q32 tx
wichtig: del. Chromosom 13 bei ca. 1/3 aller MM Patienten und 80 - 90% der Plasmazelleukämien.
Assoziiert mit schlechter Prognose.

Abb. 1.1.3.4: Modell der Myelomentstehung, modifiziert nach Hallek et al.[17]

1.1.4. Interleukin-6 als Wachstumsfaktor für das Multiple Myelom

1.1.4.1. Die Biologie des IL-6

Neben genetischen Veränderungen ist für die Pathogenese und Pathophysiologie des Multiplen Myeloms die Wechselwirkung zwischen maligner Plasmazelle und dem Knochenmarkstroma ("Microenvironment") von zentraler Bedeutung. Insbesondere die Produktion von Zytokinen (Wachstumsfaktoren) durch Knochenmarkstromazellen spielt für das Wachstum von Myelomzellen eine wichtige Rolle. In den letzten Jahren konnte mit Interleukin-6 (IL-6) ein Zytokin charakterisiert werden, das für Wachstum und Differenzierung sowohl normaler als auch maligner Plasmazellen von Bedeutung ist [41, 42, 43]. IL-6 hat pleiotrope physiologische Wirkungen auf hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Zellen. So vermittelt IL-6 die Expansion von normalen Plasmazell-Vorläufern (Plasmablasten) und induziert die Differenzierung von reifen B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen [43]. Desweiteren spielt IL-6 bei der Akut-Phase-Antwort eine wichtige Rolle; es stimuliert z.B. die Synthese von Akut-Phase-Proteinen wie CRP (C-reaktives Protein) in Hepatozyten [43].

Es konnte gezeigt werden, daß es nicht möglich ist, bei IL-6 "Knock-out" Mäusen Plasmozytome zu induzieren oder bereits etablierte (syngene) Plasmozytomzellen zu propagieren, während dies bei anderen Mäusen ohne weiteres möglich war [44]. Entsprechend entwickeln bestimmte Stämme transgener Mäuse, die humanes IL-6 überexprimieren,

Plasmozytome [45]. Diese Experimente sprechen für eine essentielle Bedeutung des IL-6 für das Wachstum von Plasmozytomzellen bei Mäusen. Verschiedene Beobachtungen weisen daraufhin, daß IL-6 für das Wachstum humaner Myelomzellen möglicherweise eine ähnlich wichtige Bedeutung hat. So sind fast alle von Patienten gewonnenen Myelomzelllinien (zumindest initial) in ihrem Wachstum abhängig von IL-6; IL-6 kann bei frisch isolierten primären humanen Myelomzellen Wachstum induzieren; mit blockierenden anti-IL-6-Rezeptor-Antikörpern kann das Wachstum von Myelomzelllinien *in vitro* und in Mausmodellen blockiert werden [46, 47].

Der Hauptsyntheseort von IL-6 bei Myelompatienten ist das Knochenmark [48], wobei die Knochenmarkstromazellen die Hauptproduzenten sind. Es wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die zu einer erhöhten IL-6 Synthese bei Myelompatienten führen: Stromazellen können durch Kontakt mit Myelomzellen zur Steigerung der IL-6-Synthese stimuliert werden [49]. Weiterhin existiert eine gegenseitige Stimulation durch VEGF [50]. Nach langfristiger *in vitro* Kultur von Myelomzellen ist zusätzlich eine autokrine IL-6 Produktion nachgewiesen worden [51]. Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung des IL-6 abhängigen Wachstumsmechanismus für humane Plasmozytomzellen *in vitro* und in bestimmten Tiermodellen.

IL-6 ist der Hauptvertreter einer Zytokinfamilie, deren Mitglieder alle den gleichen signalvermittelnden Rezeptor (gp130) benutzen, während die Spezifität über einen zweiten zytokinspezifischen Rezeptor vermittelt wird. Weitere Mitglieder dieser Zytokinfamilie, die zum Teil ebenfalls von Knochenmarkstromazellen synthetisiert werden können, sind Oncostatin M, LIF, Cardiotrophin 1, CNTF und IL-11 [52]. Diese Zytokine kommen daher ebenfalls als Wachstumsfaktoren in Betracht; die tatsächliche Bedeutung dieser weiteren Zytokine für das Wachstum humaner Myelomzellen ist bislang jedoch noch weitgehend unklar.

1.1.4.2. Signaltransduktionswege

Die extrazelluläre Bindung von IL-6 an die alpha-Kette (gp80) des IL-6 Rezeptors induziert die Bildung eines transmembranen Rezeptorkomplexes, der zu einer Dimerisierung der signaltransduzierenden β -Kette (gp130) führt [53]. Dieser Rezeptorkomplex aktiviert zwei intrazelluläre Signalkaskaden: den sogenannten JAK-STAT- Signalweg und den Ras-MAP-Kinase-Signalweg [17]. Beim JAK-STAT-Weg führt die Bildung des tetrameren Rezeptorkomplexes zur Phosphorylierung und Aktivierung sogenannter Januskinasen (vor allem JAK-2 und JAK-1) (42). Dies führt im nächsten Schritt wiederum zur Phosphorylierung von STAT-Proteinen (signal transducer and activator of transcription); bei Myelomzellen

ist in erster Linie STAT-3 aktiviert [54]. STAT-Proteine sind in inaktiver Form im Zytoplasma lokalisiert und werden innerhalb von Minuten nach Ligandenbindung phosphoryliert und aktiviert. Nach Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste bilden STAT-Proteine Dimere und translozieren in den Zellkern. Dort aktivieren sie die Transkription sogenannter IL-6 Zielgene, zu denen z.B. das Anti-Apoptose Protein Bcl-xL zählt (Übersicht: [17, 55]). Ob STAT-3 in humanen Myelomzellen neben IL-6 über IL-6-gp130-JAK-unabhängige Mechanismen aktiviert werden kann, ist noch unklar. Ebenfalls unklar ist, ob eine STAT-3 Aktivierung für Wachstum und Überleben von Myelomzellen essentiell ist oder ob weitere Signalwege eine Rolle spielen. Ein zweiter über gp130 aktivierter Signalweg ist der Ras-MAPK-Weg, der zur Induktion von Proliferation führen kann [56]. Ras-Proteine sind Membran-assoziierte GTPasen (Guanosintriphosphatasen). Dabei ist die Farnesylierung und nachfolgend Zellmembranverankerung eine wichtige Voraussetzung für die Funktion der RAS-Proteine. Sie sind den Rezeptor- und Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen nachgeschaltet und somit wichtige Mediatoren unterschiedlicher biologischer Wachstums- und Differenzierungssignale. In Myelomzellen führt die Bildung des IL-6-Rezeptorkomplexes zur Aktivierung von Ras (Übersicht: [17]); dies bewirkt unter Beteiligung von mehreren dazwischengeschalteten Kinasen (Raf-1, MKK) die Aktivierung von MAPK (mitogen activated protein kinase). MAPK wiederum phosphoryliert und aktiviert Transkriptionfaktoren wie NF-IL-6, c-Myc, c-Fos und c-Jun. Neben IL-6 führt onkogenes (also mutiertes) Ras ebenfalls zu einer Aktivierung von MAPKinasen und deren Substraten und somit zu einer erhöhten Proliferationsrate von Myelomzellen [57]. Wie beim JAK-STAT-Weg so ist auch beim RAS-MAPK-Weg unklar, inwieweit bei Myelomzellen hier gp130-unabhängige Aktivierungsmechanismen eine Rolle spielen. Ebenso ungeklärt ist die genaue Rolle dieses Signalwegs für Wachstum bzw. Überleben von humanen Myelomzellen. In jüngerer Zeit wurde mit dem Akt-Signalweg ein dritter ebenfalls durch IL-6 aktivierbarer Signaltransduktionsweg beschrieben. Die Blockade dieses Signalweges induziert eine Wachstumsinhibition in Myelomzellen [58, 59]. Die genaue Bedeutung dieses Signalweges für das Überleben von Myelomzellen ist ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung.

1.1.4.3. Spezifische IL-6 Rezeptorantagonisten

Die zentrale Rolle von IL-6 als Wachstumsfaktor für Myelomzellen legt die Entwicklung neuer Therapiestrategien mit dem Ziel der IL-6 Blockade nahe. Spezifische Antagonisten des IL-6-abhängigen Wachstums stellen blockierende monoklonale anti-IL-6- oder anti-IL6-Rezeptor-Antikörper dar. Beide Strategien können Myelomwachstum sowohl *in vitro* als auch *in*

in vivo blockieren [47, 60]. Es wurde jedoch beschrieben, daß der Antikörper/IL-6 Komplex zu einer Stabilisierung des IL-6 und somit zu einer deutlichen Verlängerung der Halbwertszeit von IL-6 *in vivo* führt. Dies wiederum hat zur Folge, daß der antagonisierende Effekt des Antikörpers teilweise wieder aufgehoben wird [61, 62]. Ein möglicher alternativer Ansatz stellt daher die Entwicklung von hochaffinen und spezifischen IL-6-Rezeptor-Antagonisten dar.

Durch gezielte Punktmutationen, die zum Austausch von 12 Aminosäuren in den α -helikalen Domänen des IL-6-Moleküls führen, konnte in der Arbeitsgruppe von Gennaro Ciliberto (IRBM, Rom) eine IL-6 Mutante hergestellt werden, die nach wie vor spezifisch an die α -Kette des IL-6 Rezeptors bindet, aber keinen Komplex mehr mit der signaltransduzierenden β -Kette bilden kann. Dieses Molekül ist somit ein spezifischer kompetitiver Antagonist von IL-6, der von den Autoren SANT7 (Superantagonist-7) bezeichnet wurde. Der IL-6 Rezeptorantagonist SANT7 hat eine etwa 70-fach höhere Bindungsaffinität zur α -Kette als humanes IL-6 und keine intrinsische Aktivität mehr [63]. Es konnte gezeigt werden, daß solche IL-6 Rezeptorantagonisten effizient das Wachstum von humanen Myelomzelllinien blockieren können. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß die Behandlung humaner Plasmazytomzellen mit SANT7 Zelltod (Apoptose) auslösen kann [64]. In der Arbeitsgruppe von Stefan Rose-John (Universität Kiel) konnten neben IL-6-selektiven Rezeptorantagonisten breiter wirksame gp130-Antagonisten entwickelt werden, welche die gp130-Dimerisierung und somit das komplette gp130-vermittelte Signaling blockieren [65]. Somit können solche Antagonisten die Aktivierung durch alle Mitglieder der IL-6-gp130 Zytokinfamilie inhibieren.

1.1.4.4. Blockade der intrazellulären Signalkaskade

Eine weitere Möglichkeit für die Entwicklung neuer Therapiestrategien liegt in der Entwicklung von Substanzen, die mit Molekülen der IL-6/gp130-vermittelten intrazellulären Signalkaskade interferieren. Von Bedeutung sind u.a. Inhibitoren der Ras-Farnesyltransferasen (Farnesyltransferaseinhibitoren: FTI), die spezifisch die signaltransduzierende Aktivität der Ras-Proteine und somit den RAS/MAPK-Weg blockieren können [66]. Tyrphostine können den JAK-STAT-Signalweg durch selektive Inhibition der JAK-Kinasen-Familie (insbesondere JAK-2 und JAK-1) blockieren [67]. Entsprechend führte die Behandlung von IL-6-abhängigen Myelomzelllinien mit dem Tyrphostin AG490 in hohen Dosierungen, ähnlich wie die Behandlung mit dem IL-6-Rezeptorantagonist SANT7, zur Inhibition der STAT-3-Aktivität und erhöhter Apoptosesensitivität [54]. Insgesamt ist die Rolle sowohl von FTIs als auch von Tyrphostinen für Wachstum, Überleben und Resistenz für das multiple Myelom noch wenig

untersucht. Die mögliche therapeutische Bedeutung dieser Substanzen für die Behandlung des multiplen Myeloms ist daher noch weitgehend unklar.

1.2. Knochenmarkstromazellen als zelluläre Vehikel

1.2.1. Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von KMSZ

Die Beschreibung von Knochenmarkstromazellen als eigene zelluläre Entität ging zurück auf Arbeiten von A. J. Friedenheim aus den 60-er und 70-er Jahren. Er entdeckte, dass sich aus Knochenmarksproben adhärente Zellen isolieren lassen, die zunächst morphologisch als fibroblastoid beschrieben werden können [68, 69]. Die Isolierung der Zellen erfolgte lediglich durch ihre starke Plastikadhärenz, was sie vom Grossteil der hämatopoetischen Zellen unterscheidet, denn im humanen System sind initial weniger als 30% der adhärennten Zellen hämatopoetischen Ursprungs (dies sind v.a. Monozyten und Makrophagen). Nach einer Kulturdauer von ca. 2 Wochen sind durch die kurze in-vitro Überlebensdauer der verbliebenen hämatopoetischen Zellen ausschließlich Stromazellen in der Kultur zu finden. Die so gewonnenen Zellen lassen sich über einen Zeitraum von mehreren Wochen bis Monaten für primäre Zellen ungewöhnlich stark expandieren. So sind im Mittel bis zu 38 Populationsverdopplungen und eine resultierende Expansion um das $1,2 \times 10^9$ -fache beschrieben [70].

Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass diese Zellen Progenitoreigenschaften aufweisen, da sie in mehrere mesenchymale Zelltypen wie z.B. Osteoblasten, Chondroblasten, Adipozyten und Myoblasten oder sogar zu Geweben differenzieren können, was ihnen fälschlicherweise auch den Namen „mesenchymale Stammzellen“ einbrachte. Selbst eine neurale Differenzierung von Stromazellen wurde beschrieben. Diese Differenzierungswege lassen sich durch Zugabe verschiedener Substanzen induzieren bzw. beschleunigen: so vermittelt Hydrocortison z.B. adipozytäre Differenzierung, während Vitamin D Derivate und verschiedene Zytokine die Entwicklung zu Osteo- und Chondroblasten begünstigen können. Neben löslichen Faktoren produzieren KMSZ auch wichtige Bestandteile der Extrazellulärmatrix, so z.B. unterschiedliche Kollagenarten und Fibronectin. Ein wesentlicher Unterschied zu z.B. hämatopoetischen Progenitorzellen liegt in der enormen Plastizität des Stromazellsystems. So sind im Gegensatz zu hämatopoetischen Zellen einmal begangene Differenzierungswege nicht irreversibel, d.h. auch nach einmal erfolgter Differenzierung ist eine weitere phänotypische Veränderung der

Stromazelle in einen anderen Zelltyp möglich.

Aufgrund ihrer unmittelbaren räumlichen Nähe zu den hämatopoetischen Stammzellen sowie der Tatsache, dass Knochenmarkstromazellen zur Durchführung sogenannter „Stammzellassays“, eines in-vitro Verfahrens zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit hämatopoetischer Stammzellen, als „feeder-layer“ benutzt werden können, lässt auf eine Beteiligung von KMSZ an der Blutbildung schliessen. Diese Vermutung wird bestärkt durch die Beobachtung, dass KMSZ eine ganze Reihe für die Hämatopoese wichtige Zytokine sezernieren, so z.B.: IL-1, IL-6, IL-7, IL-11, G-CSF, GM-CSF und Stammzellfaktor (c-kit Ligand). Eine Arbeit beschreibt eine beschleunigte hämatopoetische Rekonstitution wenn kurz nach sublethaler Bestrahlung KMSZ transplantiert wurden [71].

Eine weitere sich aus der Lokalisation der KMSZ ableitende Funktion liegt in der Beteiligung an der Knochenbildung und Frakturheilung. So kann die osteoblastäre Differenzierung der KMSZ eine Rolle im permanent ablaufenden Knochenumbau spielen. Die Fähigkeit zur chondrozytären Differenzierung entspräche demnach einer Beteiligung von KMSZ in der Kallusbildung nach Fraktur eines Knochens, wobei die Datenlage hier nicht eindeutig ist. Die Fähigkeit zur Adipozytenbildung reflektiert den mit dem Alter zunehmenden Ersatz des blutbildenden Knochenmarks durch Fettmark. Auch wird eine Umwandlung von Osteoblasten in Adipozyten mit bestimmten Formen der Osteoporose assoziiert (Übersicht: [72, 73, 74, 75]).

1.2.2. „Homing“ von KMSZ

Analog zu hämatopoetischen Stammzellen haben auch diese nicht-hämatopoetischen Progenitoren die Fähigkeit des sogenannten „Homings“. Dieser Begriff beschreibt den Vorgang, dass Zellen nach i.v. Injektion in die Körperperipherie in der Lage sind in ihr ursprüngliches Körperkompartiment einzuwandern. Mehrere Arbeiten beschreiben dabei in Tiermodellen neben dem Knochenmark unterschiedliche weitere Zielorgane in denen sich transplantierte KMSZ in unterschiedlichem Ausmass nachweisen lassen, v.a. Leber, Lunge und Milz [72, 76, 77, 78]. Ob es sich dabei lediglich um ein „Hängenbleiben“ der recht grossen KMSZ in den feinen Kapillarsystemen dieser Organe oder tatsächlich um ein gerichtetes Homing handelt ist allerdings unklar. Übereinstimmend wird jedoch in allen Publikationen ein Einwandern infundierter KMSZ in das Knochenmark beschrieben. In zwei Arbeiten wurde sogar berichtet, dass transplantierte KMSZ nicht nur in das Knochenmark einwandern, sondern dort auch zu voll funktionsfähigen Osteozyten differenzieren können (Übersicht: [75]). Trotz dieser Daten muss

auf dem Gebiet der systemischen Anwendung von KMSZ noch viel Arbeit geleistet werden, da nur sehr wenig quantitative Daten über das Homing von Stromazellen zur Verfügung stehen.

1.2.3. KMSZ als Zielzellen für die somatische Gentherapie

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften von Stromazellen zeichnen sich drei potentielle klinische Anwendungen dieser Zellen ab: erstens die Nutzung der Plastizität von KMSZ zur Therapie lokalisierter Skelettschäden. Hierzu existieren bereits laufende klinische Studien. Zweitens, und deutlich komplexer, der Einsatz von KMSZ zur Therapie systemischer Knochenschäden. Hierzu gibt es ebenfalls bereits erste klinische Daten zum Einsatz der Knochenmarktransplantation (einschliesslich KMSZ) zur Behandlung der Osteogenesis Imperfecta (Übersicht: [74, 75]). Drittens führte die Fähigkeit des „Homings“ sowie die Tatsache, dass sich diese Zellen in-vitro sehr einfach kultivieren und expandieren lassen zur Entwicklung einer ganzen Reihe von Konzepten zur gentherapeutischen Nutzung dieser Zellen. Ein weiterer Vorteil dieses Zelltyps in der gentherapeutischen Anwendung ist die, im Gegensatz zu hämatopoetischen Stammzellen, einfache und effektive Genmodifikation mit Hilfe rekombinanter Retroviren. So lassen sich primäre humane KMSZ durch repetitive retrovirale Transduktion mit einer Effektivität von ca. 20 - 80% genmodifizieren [79]. Am weitesten entwickelt scheinen hier die Arbeiten zur Korrektur der Hämophilie A und B durch genmodifizierte Knochenmarkstromazellen zu sein. Hier konnte in Tiermodellen mit Hunden bereits gezeigt werden, dass retroviral modifizierte KMSZ zumindest transient in der Lage sind einen therapeutisch wirksamen Spiegel an humanem Faktor IX zu synthetisieren [80, 81, 82]. Diese Arbeiten belegen somit, dass es prinzipiell möglich ist mit Hilfe genmodifizierter KMSZ potentiell therapeutische Proteine im Knochenmark zu synthetisieren.

Die Sicherheit und Durchführbarkeit der Infusion isolierter und expandierter humaner KMSZ wurde in einer klinischen Phase 1 Studie gezeigt. Hierbei erhielten 15 Patienten bis zu 5×10^7 KMSZ nebenwirkungsfrei infundiert [83].

1.3. Grundlagen des retroviralen Gentransfers

1.3.1. Aufbau und Lebenszyklus von Retroviren

Die Familie der Retroviridae kann in drei Subfamilien unterteilt werden, die alle klinische Relevanz haben: 1. Oncovirinae, die mit dem murinen (Maus) Moloney Leukämie Virus (Mo-MuLV) das Virus für die Entwicklung der gentherapeutischen Standardvektoren stellen, 2. Lentivirinae, die mit HIV I und HIV 2 als Erreger von Aids und jüngst in stark modifizierter Form auch für gentherapeutische Zwecke Bedeutung haben [84, 85], 3. Spumavirinae oder „foamy viruses“, die ebenfalls erst kürzlich für einen gentherapeutischen Einsatz evaluiert wurden [86]. Das Retrovirus ist behüllt und besitzt einen inneren "Kern", der aus einer ikosaedralen (von 20 gleichseitigen Dreiecken begrenzten) Proteinschale, dem Kapsid, zwei Kopien der viralen genomischen mRNA und den drei zur Infektion benötigten Enzymen Protease, Reverse Transkriptase und Integrase besteht. Diese viral kodierten Strukturen („gag“ und „pol“) bringt das Virus vom letzten Zyklus in der letzten Wirtszelle mit. Eine nach aussen an das Kapsid angrenzende Matrixproteinschicht stellt die Verbindung zur Hülle her, die von der Plasmamembran der letzten Wirtszelle abgeleitet ist und aus einer Phospholipiddoppelschicht besteht. In der Hülle befinden sich außerdem viral kodierte Glykoproteine ("env"), die in Abhängigkeit vom Wirtsspektrum der Viren eine Bindung an Rezeptoren der Zelloberfläche vermitteln und die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran vermitteln. Nach einer solchen Membranverschmelzung wird das Virus internalisiert, der "Kern" gelangt ins Zytoplasma und von dort aus in den Zellkern. Hier kommen zwei der drei mitgebrachten viralen Enzyme zum Einsatz: Die Reverse Transkriptase schreibt die genomische RNA in eine doppelsträngige cDNA (=Provirus) um, und die Integrase baut das Provirus in das Wirtszellchromatin ein. Der "Kern" kann bei Oncovirinae (anders als bei Lentivirinae) eine intakte Nuklearmembran nicht passieren, daher ist eine Zellteilung für die erfolgreiche Fortführung des viralen Lebenszyklus erforderlich. Die Integration des Provirus in das Genom erfolgt zufällig, möglicherweise mit einer leichten Häufung in transkriptionell aktiven Bereichen. Es entsteht immer die Abfolge LTR-Gene-LTR. Die beiden identischen "long terminal repeats" (LTRs) begrenzen das integrierte Provirus auf beiden Seiten und beinhalten regulatorische Sequenzen (Promotor, Enhancer, Poly A-Schwanz). Dazwischen liegen die viralen Gene, namentlich "gag" für die Kernproteine, "pol" für Reverse Transkriptase und Integrase sowie "env" für zwei verschiedene Glykoproteine der Hülle. Aus „full length“ Transkriptionsprodukten werden „gag“ und „gag-pol“

Polyproteine translatiert, aus einem kleineren „gespleisten“ Transkript entsteht „env“. Ein weiteres „full length“ Transkript wird als genomische RNA verpackt. Die genomische RNA bindet über ihre 5' gelegene Verpackungssequenz (Psi) an das „gag“ Polyprotein, während die „gag“ und „gag-pol“ Polyproteine oligomerisieren. Die gebildeten Komplexe verlassen die Zelle über einen als "budding" bezeichneten Prozess, bei dem das Kapsid von Bereichen der Plasmamembran, in die sich virale Hüllproteine eingelagert haben, umschlossen wird. Infektiosität erreichen die Viren dann durch Protease-vermitteltes Schneiden der „gag“ -und „gag-env“-Polyproteine in ihre einzelnen Bestandteile (Übersicht: [87]).

1.3.2. Rekombinante Retroviren

Da Viren sich nur in Zellen vermehren können, bedient man sich auch in der Gentherapie zur Virusproduktion der Zellkultur. Bei der Herstellung einer Virus-produzierenden Zelllinie (VPC) geht man so vor, daß zunächst ein volles retrovirales Genom, dem aber die Verpackungssequenz fehlt, in eine (meistens) Maus-Fibroblastenzelllinie transfiziert wird. Es werden nun Viruspartikel gebildet, die "leer" bleiben, da die virale RNA ohne Verpackungssequenz nicht an das „gag“-Polyprotein im sich aufbauenden Kapsid binden kann. Eine solche Zelllinie nennt man Verpackungszelllinie. Im nächsten Schritt wird ein retrovirales Plasmid transfiziert, bei welchem „gag“, „pol“ und „env“ durch das Transgen ersetzt wurden, und was aufgrund seiner erhaltenen Verpackungssignalsequenz von den leeren Viruspartikeln gebunden werden kann. Die VPCs geben nun Viren in den Zellkulturüberstand ab, die eine Zielzelle einmalig infizieren können und auch zur Integration ins Wirtszellgenom mit Expression eines Transgens befähigt sind, aber keine neuen Virusstrukturelemente aufbauen können, also replikationsinkompetent sind. Neben dem Verpackungssignal verbleiben auf dem transgenen Virusgenom die beiden LTRs und spezifische, nahe den LTRs gelegene Bereiche, die für eine korrekte reverse Transkription und Integration von Bedeutung sind. Die Aufnahmekapazität für Fremd-DNA beträgt dann bis zu 8 kb, was, je nach Gengröße, 1-3 Transgenen entspricht. Die Aufnahme eines (Antibiotikum)-Resistenz-Gens oder eines Oberflächenmarkers, neben dem eigentlichen Transgen, eröffnet die Möglichkeit einer in vitro-Selektion einer Zielzellkultur und einer Anreicherung transduzierter Zellen. Die Expression kann von einem einzelnen Promotor, gewöhnlich der 5' LTR, gesteuert werden. Entweder wird durch entsprechendes Platzieren von "splice-donor und acceptor sites" ein Transkript aus einem langen Transkript „gespliced“ oder beide Gene liegen auf einem langen Transkript, das aufgrund einer IRES-Sequenz (Interne Ribosomale Eintrittsstelle) differentiell

translatiert wird, bzw. ohne eine solche für ein Fusionsprotein kodiert. Alternativ können die beiden Gene auch durch die LTR und einen internen Promotor gesteuert werden, wobei die interne Expressionskassette auch in reverser Orientierung liegen kann, was eine geringere Beeinflussung durch die LTR zu ermöglichen scheint.

1.3.3. Sicherheitsaspekte

Grosse Sicherheitsbedenken bei der Verwendung retroviraler Vektoren gehen von der Gefahr einer Entstehung replikationskompetenter Retroviren (RCRs) mit dem Risiko Vektor-induzierter maligner Transformation aus. Tatsächlich wurde die Entstehung aggressiver T-Zellymphome in 3 von 5 Primaten dokumentiert, die hämatopoetische Stammzellen erhalten hatten, welche mit RCR-positiven Virusproben kontaminiert waren [88].

Die erste Generation der Verpackungszelllinien für Moloney Maus Leukämie Virus (MoMLV) abgeleitete Vektoren (Psi 2 und Psi am) basierten auf der Transfektion mit einem MoMLV-Genom, das in der Verpackungssignalsequenz deletiert war [89] Cone und Mulligan, 1984). Da ein einzelnes rekombinatorisches Ereignis mit dem, im zweiten Schritt transfizierten, das Transgen und eine Verpackungssequenz tragenden Virusgenom genügt, um ein komplettes und verpackbares Virusgenom zu generieren, entstehen in solchen VPCs relativ häufig replikationsfähige Viren. Beim retroviralen "budding" wird neben dem transgenen Genom trotz fehlender Verpackungssequenz in einem geringen Prozentsatz (0,1%) auch die Strukturgen (oder Helfer)-RNA verpackt. In Abhängigkeit von der Homologie der beiden Transkripte, kann bei der reversen Transkription in der Zielzelle eine homologe Rekombination stattfinden. Man ist daher bemüht, die Homologie zwischen Vektor- und Helfergenom so gering, wie möglich zu halten [90]. Verpackungszelllinien der zweiten und dritten Generation wurden in den letzten Jahren außerdem so konstruiert, daß die Zahl der nötigen rekombinatorischen Ereignisse auf zwei bzw. drei erhöht wird, ehe sich Wildtypviren entwickeln können [91, 92]. Auch die Spezieszugehörigkeit der Verpackungszelllinien (Maus) und der Zielzellen (z.B. Mensch) spielt eine Rolle. Einerseits können selbst Drittgenerations-VPCs endogene Mausvirusgenome enthalten, verpacken und weitergeben, andererseits gewährleistet die Inaktivierung von Mausviren durch das humane Komplementsystem einen gewissen Schutz.

Darüberhinaus sind gerade in jüngster Vergangenheit zwei Fälle von akuten Leukämien beschrieben worden, die im Rahmen von Gentherapiestudien mit rekombinanten Retroviren zur Behandlung von SCID-erkrankten Kindern aufgetreten sind. Allerdings wurden hier keine RCR

nachgewiesen, sondern es handelte sich um maligne Transformation durch insertionelle Mutagenese mit nachfolgender Aktivierung von Onkogenen [93, 94].

2. Zielstellung der Arbeit

Trotz intensiver Bemühungen konnte seit der Einführung des MP Schemas in den 60er Jahren kein entscheidender therapeutischer Durchbruch in der Behandlung des multiplen Myeloms erzielt werden. Dies steht im Gegensatz zum seitdem deutlich gestiegenen Erkenntnisstand über die Biologie dieser Erkrankung, im Besonderen über molekulargenetische Veränderungen und den Einfluss von Wachstumsfaktoren im Rahmen des Tumormikromilieus im Knochenmark. Eine herausragende Stellung im Rahmen dieses Mikromilieus hat das Zytokin IL-6 welches v.a. von Knochenmarkstromazellen produziert wird und in der Literatur als essentieller Wachstums- bzw. Überlebensfaktor für Myelomzellen beschrieben ist. Darüberhinaus gilt IL-6 für die Myelomzellen als entscheidender Resistenzfaktor gegen pharmakologisch und auch immunologisch induzierte Apoptose, sodass eine IL-6 Blockade v.a. auch in Kombination mit anderen Therapien sinnvoll sein könnte. Um nun den Weg einer in-vivo Blockade von IL-6 zu verfolgen existieren prinzipiell drei Möglichkeiten:

1. die Verwendung IL-6 blockierender Antikörper
2. die Verwendung blockierender Antikörper gegen den IL-6 Rezeptor
3. die Verwendung von IL-6 Mutanten als funktionelle Rezeptorantagonisten.

Die Verwendung pharmakologischer Moleküle als Inhibitoren des IL-6/IL-6 Rezeptorkomplexes scheidet aufgrund der grossen Interaktionsflächen zwischen den beteiligten Molekülen aus (R. Savino, persönliche Mitteilung). Bei der Verwendung IL-6 blockierender Antikörper können hingegen folgende Probleme auftauchen:

1. Verlängerung der IL-6 Halbwertszeit durch Stabilisierung in der Bindung mit dem Antikörper, dadurch
2. Rebound-Phänomen nach Absetzen

Aus diesem Grund ist eine effektive in-vivo Reduktion von zirkulierendem IL-6 nur durch einen „Cocktail“ aus mindestens drei verschiedenen blockierenden anti-IL-6 Antikörpern möglich. Aus diesen Gründen schied dieser Weg aus. Da ein blockierender Antikörper gegen den IL-6 Rezeptor nicht zur Verfügung stand entschied sich die Arbeitsgruppe zur Verwendung des IL-6 Rezeptorantagonisten SANT7.

Allerdings stellt die IL-6 Antagonisierung mittels des spezifischen kompetitiven Rezeptorantagonisten SANT7 v.a. auch ein quantitatives Problem dar, da trotz einer ca. 70-fach höheren Affinität zum IL-6 Rezeptor (im Vergleich zu IL-6) ein molarer Überschuss für eine effektive Blockade benötigt wird. Um die biologisch wirksame Konzentration dieses

Antagonisten bei einer möglichen klinischen Anwendung weiter zu verbessern, wäre es also wünschenswert, durch lokale Expression eine möglichst hohe Wirkkonzentration im Knochenmark zu erzielen. Als mögliche Produzentenzellen für diese lokale Expression bieten sich hierbei aufgrund ihrer unmittelbaren räumlichen Nähe zu Myelomzellen, ihrer guten Transduzierbarkeit und Fähigkeit zur in-vitro Expansion sowie ihrer Fähigkeit des „Homings“ nach peripherer Infusion die Knochenmarkstromazellen an. Hierbei zeigt sich ein weiterer entscheidender Vorteil des SANT7 Moleküls gegenüber den anderen aufgeführten Optionen zur IL-6 Blockade, denn nur dieses monomere Peptid lässt sich durch Einsatz etablierter Gentransferverfahren von transduzierten Zielzellen herstellen. Die vorliegende Arbeit soll ein in-vitro Modell zum gentherapeutischen Einsatz eines IL-6 Rezeptorantagonisten als Mittel zur Beeinflussung des Tumormikromilieus im Knochenmark liefern. Folgendes Prozedere wäre hierbei denkbar: Gewinnung von autologen Knochenmarkstromazellen, z.B. durch Knochenmarkpunktion, anschliessend in-vitro Transduktion und Expansion der KMSZ mit nachfolgender Reinfusion. Die Arbeit befindet sich hierbei fern der klinischen Anwendung und soll orientierende in-vitro Daten liefern. Aus diesem Grund musste zunächst ein funktionierendes Gentransfersystem entwickelt werden. Weiterhin mussten zuvor grundlegende Daten über das Verhalten von Myelomzellen in Kokultur mit KMSZ gewonnen werden. Ist in SANT7 in diesem experimentellen System überhaupt in der Lage eine effektive Blockade des IL-6 Rezeptors und Zelltod zu vermitteln? Zuerst allerdings musste mangels kommerzieller Verfügbarkeit ein Verfahren zur Produktion genügend grosser und reiner Mengen von rekombinantem SANT7 Protein etabliert werden. Folgende konkrete Fragestellungen sollten im Rahmen dieser Arbeit also beantwortet werden:

1. Erarbeitung eines Protokolls zur Aufreinigung von SANT7 Protein.
2. Wie verhalten sich Myelomzellen in Kokultur mit KMSZ bezüglich Wachstum und Überleben in Gegenwart und Abwesenheit von SANT7?
3. Konstruktion eines retroviralen Gentransfersystems zur Transduktion humaner Knochenmarkstromazellen.
4. Testung der Gentransfereffizienz in KMSZ und Kontrolle der SANT7 Expression durch transduzierte KMSZ.
5. Lassen sich kokultivierte Myelomzellen durch Transduktion der KMSZ in Wachstum und Überleben inhibieren?

3. Material und Methoden

3.1. Klonierung der SANT7 c-DNA

Die Klonierung der SANT7 c-DNA erfolgte über mehrere Zwischenschritte mit Hilfe mutagener Primer mittels PCR und Standardverfahren der rekombinanten DNA-Technologie. Zunächst wurde aus der IL-6 sezernierenden Hodgkin Zelllinie HD-MyZ Komplett-RNA isoliert und eine c-DNA Synthese durchgeführt. Dann wurden mit Hilfe mutagener Primer 3 verschiedene PCR Reaktionen 1-3 durchgeführt, wobei alle 3 PCR Produkte SANT7 spezifische Mutationen gegenüber der wildtyp IL-6 c-DNA enthalten (siehe Schema Abb. 3.1.1). Hierbei entspricht das PCR-Produkt 3 der gesamten Länge der IL-6 c-DNA und enthält c-terminal 3 veränderte Codons, die zu entsprechenden Aminosäureaustauschen führen. Die Fragmente 1 und 2 entsprechen Teilen der IL-6 c-DNA und enthalten jeweils zwei veränderte Codons. Alle drei resultierenden Fragmente wurden in den Klonierungsvektor pGem-T EASY kloniert. Danach wurden sie sequenziert und zur SANT1 (ein Vorläufer des SANT7,[95]) c-DNA zusammengefügt (siehe Abb. 3.1.1. A). Mittels einer weiteren PCR Reaktion mit mutagenen Primern (Abb. 3.1.1. B) und anschließender Umklonierung wurde aus der SANT 1 die SANT 7 c-DNA. Daraus ergaben sich wie in Tabelle 3.1 dargestellt folgende definitive Veränderungen der Aminosäuresequenz von SANT7 gegenüber wildtyp IL-6:

Tabelle 3.1: modifiziert nach [63], Leerstellen bezeichnen mit IL-6 identische Aminosäuren. Die obere Zeile bezeichnet die ursprünglichen Aminosäuren mit ihrer Position für wildtyp IL-6. Die unteren Zeilen zeigen die jeweiligen Aminosäureaustausche für SANT1 und SANT7.

IL-6	Y	G	L	E	N	Q	S	S	V	Q	S	Q
	31	35	57	59	60	75	76	118	121	175	176	183
SANT1	D	F						R	D	I	R	A
SANT7	D	F	D	F	W	Y	K	R	D	I	R	A

Aufgrund der hohen Homologie von SANT 7 und IL-6, sowie zur einfacheren Produktion von SANT 7 als rekombinantem Protein war es notwendig ein kombiniertes myc-His Tag C-terminal anzufügen. Mit Hilfe dieses Tags kann SANT 7 mit immunologischen Methoden von IL-6 z.B. in Zellkulturüberständen unterschieden werden. Weiterhin ist so eine Proteinaufreinigung über eine Nickelchelatsäule möglich (siehe 3.2). Auch das Anfügen des myc-His Tags erfolgte mit

Hilfe zweier aufeinanderfolgender PCR Reaktionen zunächst für das myc-Tag und anschliessend für das His-Tag mit nachfolgender Ligation (Fragment 5/6, Abb. 3.1.1. C). Das resultierende Konstrukt trägt den Namen SANT7mH. Das verwendete PCR-Protokoll entspricht den Angaben in 3.9.

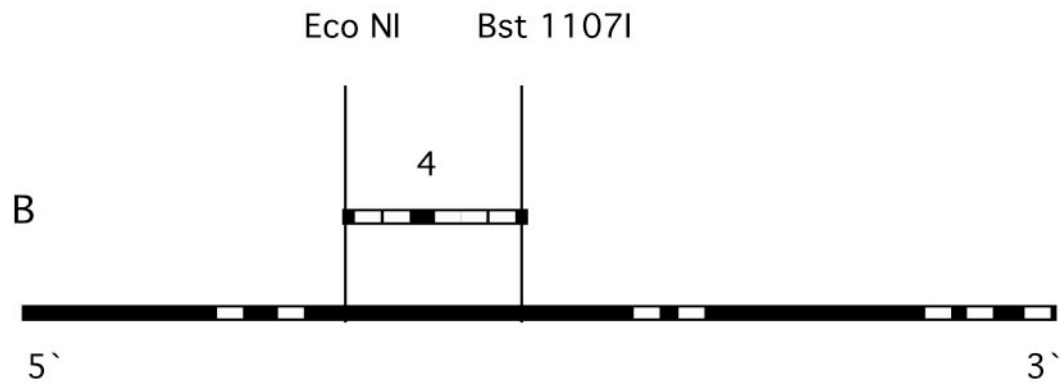
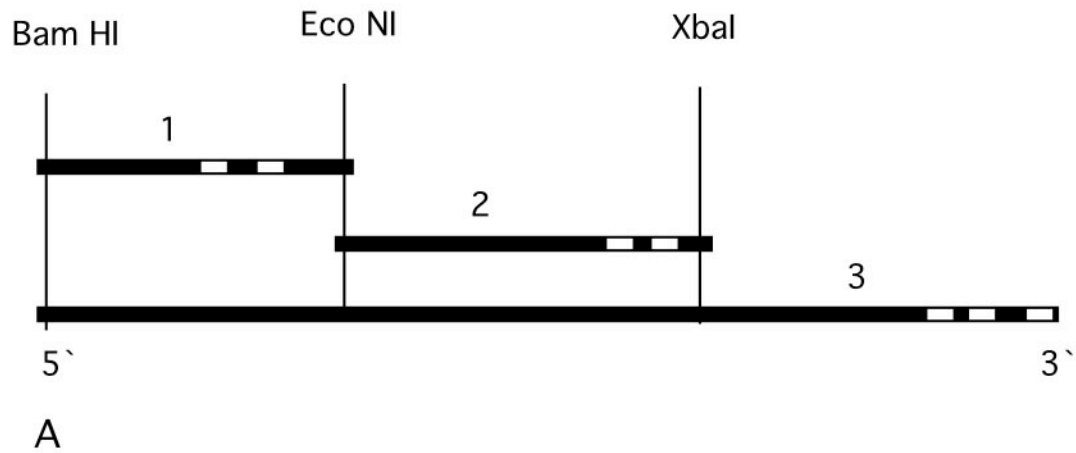


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Klonierung der SANT7mH c-DNA

Die Konstruktion erfolgte in 6 Schritten ausgehend von den oben beschriebenen PCR-Reaktionen. Schwarz dargestellt sind die dem IL-6 identischen Sequenzen, weiße Aussparungen zeigen die ungefähre Lage der 12 veränderten Kodons, der ³⁴ graue Balken in C symbolisiert das c-terminale

mycHis-Tag.

Liste der verwendeten Primer in 5` zu 3` Orientierung (die vorangestellte Zahl kennzeichnet das betreffende Fragment in Abb. 3.1.1):

- 1-sense: TCCAGGATCCCAGCTATGAACTC
- 1-antisense: GTCTCCTTTCTCAGGGCTGAGATGAAGTCGAGGATGTCCCGAATTTG
- 2-sense: CGGCATCTCAGCCCTGAGAAAGGAGAC
- 2-antisense: GCATCTAGATTCTTTGCCTTTTTCTGCAGGAACTGGATCAGGTCTTTTGTTCATC
TGCACAGC
- 3-sense: TCCAGGATCCCAGCTATGAACTC
- 3-antisense: GGTATCGATGCTACATTGCCCGAAGAGCCCTCAGGCTGCGGATCAGGAACTCC
- 4-sense: GCCCTGAGAAAGGAGACATGTAACAAGAGTAACATGTGTGAAAGCAGCAAAGAGGC
AGACGCATTCTGGAACCTG
- 4-antisense: GCCCTGAGAAAGGAGACATGTAACAAGAGTAACATGTGTGAAAGCAGCAAAGAG
GCAGACGCATTCTGGAACCTG
- 5-sense: CCGCAGCCTGAGGGCTCTTCG
- 5-antisense: CGATCTATTACAGATCTTCTTCGGAGATCAGTTTCTGTTCCATTGCCCGAAGAGCCC
- 6-sense: CCGCAGCCTGAGGGCTCTTCG
- 6-antisense: GCAGCCGGATCCTCGAGCTAGTGATGGTGATGGTGATGCGATCCTCTCAGATCTT
CTTCGGAG

3.2. Bakterielle Expression des SANT7mH Proteins

Da SANT7 nicht kommerziell erhältlich ist, musste ein Verfahren zur Proteinproduktion etabliert werden. Dies erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Arcone et al. [96] Zunächst wurde eine zur bakteriellen Expression modifizierte Variante der SANT7mH c-DNA hergestellt. Hierbei musste die sogenannte eukaryontische Leadersequenz Aminosäuren 1 - 27), die den gerichteten intrazellulären Proteintransport in Eukaryonten vermittelt, entfernt werden. Die verkürzte cDNA wurde in den bakteriellen Expressionvektor pET 15b kloniert und ein geeigneter Klon identifiziert. Danach wurden 2 Liter Bakterienkultur angesetzt bis eine O.D. (600nm) von 1,0 erreicht war. Danach erfolgte die Expressionsinduktion mit 1,5 µM IPTG. Nach 3,5h wurde die Kultur abzentrifugiert und mit einem Lysepuffer (6M GuanidinHydrochlorid (GndHCL); 0,1M NaH₂PO₄; 20mM Imidazol; 15mM beta-Mercaptoethanol, 0,1% Triton X-100;

0,01M TrisHCL pH 8,0) lysiert. Danach erfolgte durch Zugabe von 1,5mg Nickel-Agarose die Bindung des Proteins. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer (6M GndHCL; 0,1M NaH₂PO₄; 20mM Imidazol; 15mM beta-Mercaptoethanol, 0,1% Triton X-100; 0,01M TrisHCL pH 6,3) wurde durch Inkubation mit Elutionspuffer (6M GndHCL; 0,1M NaH₂PO₄; 0,01M TrisHCL pH 4,5) das Protein aus der Bindung gelöst. Nach erneuter Zentrifugation konnte das rekombinante SANT7mH aus dem Überstand in denaturierter Form gewonnen werden. Die Renaturierung zu funktionellem Protein erfolgte durch eine Zweischriddialyse: im ersten Schritt wurde gegen ein Redoxsystem aus oxidiertem und reduziertem Glutathion (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1M GdnHCl, 2mM reduziertes Glutathion, 0,2mM oxidiertes Glutathion) dialysiert, im zweiten Schritt gegen TRIS und Glycerin (50 mM Tris/HCl pH 8,0%, 10% Glycerol). Danach wurden durch Zentrifugation mit 11.000g unlösliche Proteinaggregate abgetrennt, der Überstand nach Pierce vermessen und per SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Färbung und Western-Blot biochemisch analysiert. Die funktionelle Charakterisierung erfolgte mittels Proliferationsassays und Signaltransduktionsanalysen mit der IL-6 abhängigen Myelomzelllinie INA-6.

3.3. Zellen und Medien

Die IL-6 abhängige Myelomzelllinie INA-6[97] wurde freundlicherweise von Dr. R. Burger (Erlangen) zur Verfügung gestellt und in RPMI Medium mit 20% FCS, 1% Na-Pyruvat, 1% Penicillin/Streptomycin bei 5% CO₂ kultiviert. Die Stromazelllinie HS-5 [98] wurde vom ATCC bezogen und in DMEM mit 10% FCS, 1% Na-Pyruvat, 1% Penicillin/Streptomycin bei 5% CO₂ kultiviert. Primäre humane Stromazellen wurden aus Aspiraten von diagnostischen Knochenmarkpunktionen von unterschiedlichen Spendern durch Ficoll Abtrennung und nachfolgender Adhärenz an Zellkulturgefäße generiert und in DMEM mit 20% FCS, 1% Na-Pyruvat, 1% Penicillin/Streptomycin bei 5% CO₂ kultiviert.

3.4. Nachweis der STAT 3 Phosphorylierung durch Western

Blotting

INA-6 Zellen aus verschiedenen Ansätzen mit und ohne SANT7mH wurden mit einem Lysepuffer behandelt (20 mM HEPES (pH 7,9), 350 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1% NP40, 0,5 mM dithiothreiol, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0,2 mM PMSF and 1µg/ml Aprotinin) und 50µg Protein/Ansatz auf ein 12% SDS-PAGE Gel geladen. Nach

dem Blotten und Blocken mit gelöstem Milchpulver erfolgte die Inkubation über Nacht mit 1. einem Antikörper gegen phosphoryliertes STAT3 und 2. einem Antikörper gegen unphosphoryliertes STAT3 als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge. Nach zweimaligem Waschen, Inkubation mit einem Peroxidase-konjugiertem anti-Maus Antikörper und nochmaligem Waschen erfolgte der Bindungsnachweis mit Hilfe der ECL (enhanced chemoluminescence) Technik.

3.5. Herstellung retroviraler Vektoren und stabiler Verpackungszelllinien

Die komplette SANT 7mH c-DNA wurde über die EcoRI Schnittstellen in den von der Firma MainGen in Frankfurt/Main zur Verfügung gestellten Vektor MgSLdS umkloniert, der bereits in einer klinischen Studie im Einsatz ist [99, 100]. Als Selektionsmarker für transduzierte Zellen dient in diesem System eine intrazellulär trunkierte Variante des Nerve Growth Faktor Rezeptors (dNGFR). Dieser wird durch alternatives Splicing aus einer gemeinsamen Messenger-RNA mit SANT7mH generiert. Durch membranständige Expression dieses trunkierten Rezeptors kann nun ein Nachweis transduzierter Zellen geführt werden bzw. eine Aufreinigung dieser Zellen stattfinden. Die Plasmide wurden von Fr. Dr. P. Dietz (Firma MainGen) mit Hilfe der Calciumphosphat Präzipitation in die Verpackungszelllinie PG13 transfiziert und ein geeigneter Klon selektioniert und dessen Überstand zur Verfügung gestellt. Schema siehe Abb. 3.5.

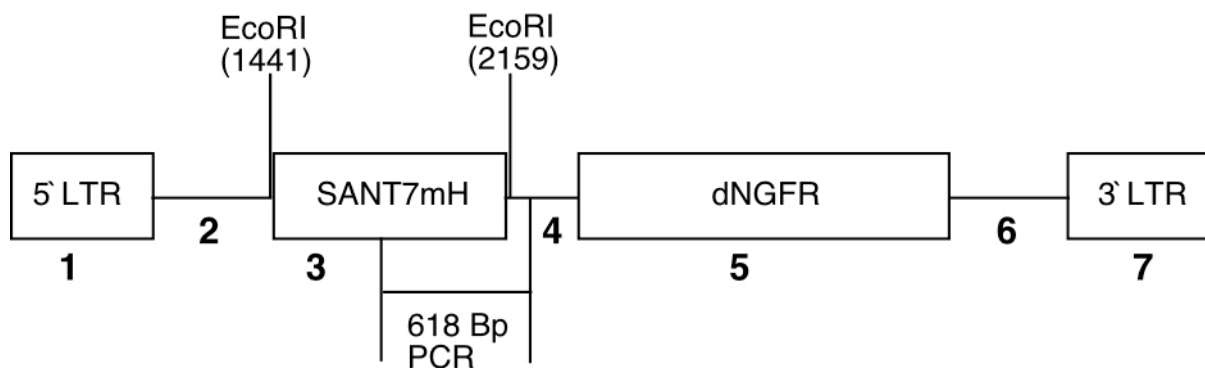


Abb. 3.5: Schematischer Aufbau des MgSLS7mH Provirus

1: 5' LTR aus dem Spleen Focus Forming Virus (SFFVp), 2: Leadersequenzen aus dem Murine Stem Cell Virus (MSCV), 3: SANT7mH c-DNA, 4: Splice Acceptor Sequenzen aus Mo-MuLV, 5: trunkierte Form des humanen low affinity Rezeptors für den Nerve Growth Faktor als Selektionsmarker, 6: synthetischer Linker, 7: 5' LTR aus dem SFFVp. 618Bp PCR: Abschnitt, der zum Nachweis der SANT7mH Expression in transduzierten Zellen amplifiziert wurde (siehe Abschnitt 3.9).

3.6. Transduktion von Zielzellen

Die retrovirale Transduktion von Zielzellen (HS-5) erfolgte durch zweimaliges Inkubieren der Zielzellen mit virushaltigen Überständen für 12 Stunden im Abstand von 24 Stunden. Dies erfolgte in Anwesenheit von 8µg/ml Polybrene. Nach weiteren 48 Stunden in normalem DMEM, 10% FCS, 1% Na-Pyruvat, 1% Penicillin/Streptomycin bei 5% CO₂ wurde die dNGFR Expression durchflusszytometrisch analysiert und die transduzierten Zellen über immunomagnetische Partikel angereichert.

3.7. Anreicherung transduzierter Zellen durch immunomagnetische Beads

Die Anreicherung erfolgte nach Angaben des Herstellers der immunomagnetischen Beads (Miltenyi Biotec). Zusammenfassend wurden die anzureichernden Zellen mit 1µg/ml eines Antikörpers gegen den Nerve-Growth-Factor Rezeptors für 15 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS erfolgte für weitere 15 Minuten die Inkubation mit 20µl einer Suspension aus an paramagnetische Partikel (Beads) gekoppelt Anti-Maus Antikörper. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in eine in einem Magneten fixierte Säule gegeben. Nach erneutem Waschen wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und die gebundenen Zellen eluiert.

3.8. Expressionsnachweis durch Durchflusszytometrie

Zum Nachweis der Expression des trunkierten NGFR wurden transduzierte Zellen mit einem Antikörper (1µg/ml) gegen NGFR bzw. einer Isotypkontrolle inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte der Bindungsnachweis über Inkubation mit einem FITC konjugiertem Ziegenanti-Maus Antikörper (F(ab)₂-Fragment im Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton-Dickinson) mit Hilfe des Cell-Quest Programmes (Becton-Dickinson).

3.9. Expressionsnachweis durch RT-PCR

Zum Nachweis der Expression des Transgens in transduzierten Zellen wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurde komplett-RNA mit Hilfe von nukleinsäurebindenden Zentrifugenröhrchen (Qiagen) isoliert und kontaminierende DNA per DNase-Verdau entfernt. Danach erfolgte zusätzlich eine m-RNA Aufreinigung nach der „Oligotex-Methode“ (Qiagen). Prinzipiell wird hierbei die m-RNA an eine oligo-dT Matrix gebunden, die restliche RNA

herausgewaschen und die gereinigte m-RNA bei 72°C wieder abgetrennt. Die isolierte m-RNA wurde mit Hilfe von Mo-MuLV RT (Moloney-Murines Leukämievirus reverse Transkriptase) in c-DNA revers transkribiert und diese in die PCR eingesetzt. Die PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. 94 °C, 1min 30s
2. 62 °C, 1min
3. 72 °C, 50s
4. Wiederholung 1 – 3: 35 Zyklen
5. 72 °C, 5min

Die verwendeten Primerpaare in 5` zu 3` Orientierung zum Nachweis der SANT7mH (618 Bp) bzw. beta-2-Mikroglobulin (Bp) Expression waren:

- SANT7 sense: TCCAGGATCCCAGCTATGAACTC
- MgSLdS anti-sense: CCAGACTCAGAGTTGGAGATGC
- Beta-2-MG sense: CCAGCAGAGAATGGAAAAGTC
- Beta-2-MG anti-sense: GATGCTGCTTACATGTCTCG

3.10. Proliferationsassays IL-6 abhängiger Myelomzellen

Proliferationsassays wurden nach der „Alamar Blue“ Methode entsprechend den Vorschriften des Herstellers (Biosource) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen kolorimetrischen Assay, bei dem ein Farbstoff durch Reduktion in der distalen mitochondrialen Atmungskette sein Absorptionsmaximum ändert. Diese Änderung des Absorptionsmaximums kann ausgemessen und der Anteil an metabolisiertem Farbstoff errechnet werden, was als Mass für Proliferation dient. Vergleichende Experimente ergaben eine strenge Korrelation mit einem Standard-³H-Thymidininkorporationsassay (Daten nicht gezeigt). Für einen Proliferationsassay wurden 6000 INA-6 Zellen/200µl/well in einer 96-well Platte mit unterschiedlichen IL-6 bzw. SANT7 Konzentrationen eingesät. Nach drei Tagen erfolgte die Zugabe von 20µl Alamar Blue Lösung. Nach Inkubation über Nacht erfolgte die photometrische Auswertung.

3.11. Kultur der Myelomzellen in Gegenwart von KMSZ

Für die Kokulturrexperimente wurden 1x10⁴ KMSZ pro Loch in einer 24-Lochplatte über Nacht ausgesät. Nach 24 Stunden wurde der Überstand entfernt und 100µl des konditionierten

Mediums wieder hinzugefügt. Danach wurden 1×10^5 Myelomzellen in 900 μ l frischem Medium hinzugefügt. Nach drei Tagen (INA-6) oder 7 Tagen (primäre Myelomzellen) wurde das Experiment mittels einer Proliferations-, Apoptose-, oder Zellzyklusmessung ausgewertet.

3.12. Messung von Apoptose bzw. Zellviabilität mit der Annexin V/Propidiumjodid (PI) Methode

Apoptotische Zellen weisen relativ früh im Verlauf des Selbstmordprogrammes eine Membranstabilität auf. Dies führt dazu, dass einige membranständige Moleküle, die normalerweise nur von intrazellulär zugänglich sind durch extrazelluläre Interaktionspartner gebunden werden können. Ein solches Molekül ist Phosphatidylserin, das mit Annexin V einen relativ spezifischen Bindungspartner aufweist und nur bei apoptotischen Zellen von extrazellulär zugänglich ist. Aus diesem Grund können apoptotische Zellen durch Markierung mit fluorochromkonjugiertem Annexin durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Durch eine Gegenfärbung mit Propidiumjodid können 4 Zellpopulationen unterschieden werden: 1. intakte, nicht apoptotische Zellen, 2. Annexin positive, PI negative Zellen in der Frühphase des programmierten Zelltodes, 3. Doppelt positive Zellen in der Spätphase des programmierten Zelltodes, 4. Annexin negative, PI positive Zellen, die durch Nekrose oder mechanische Schädigung starben oder in der Apoptose sehr weit fortgeschritten sind.

3.13. Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

Ina-6 Zellen wurden aus der Kokultur entnommen und über Nacht in 70% Ethanol bei -20 Grad Celsius permeabilisiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit $20 \mu\text{g/ml}$ PI für 15 min. bei 37 Grad Celsius. Die Messung wurde im Histogramm in einer linearen Skala aufgetragen und mit dem „Cell-Quest“ Programm ausgewertet.

3.14. Interleukin-6 Bestimmung in Kokulturen mit ELISA

Die Bestimmung der IL-6 Konzentration in den Kokulturen erfolgte mit Hilfe eines „Sandwich ELISA“ entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Der Test besteht aus einem an die Platte gekoppelten monoklonalen anti-IL-6 (Fänger-)Antikörper, sowie einem weiteren biotinylierten monoklonalen Nachweisantikörper. Nach Inkubation mit Streptavidin-konjugierter Peroxidase kann nach Zugabe des Enzymsubstrates der IL-6 Gehalt in einem Ansatz kolorimetrisch

bestimmt und anhand einer Standardreihe quantifiziert werden Als Standard dient rekombinantes IL-6.

3.15. Aufreinigung primärer Myelomzellen

Die Aufreinigung primärer Myelomzellen von 7 Patienten erfolgte mittels eines immunomagnetischen Verfahrens (paramagnetische „Beads“). Die Anreicherung erfolgte nach Angaben des Herstellers der immunomagnetischen Beads (Miltenyi Biotec). Die Beads waren an einen anti CD138 (Syndecan-1) Antikörper gekoppelt, ein Marker der im Knochenmarksmilieu exklusiv auf Plasmazellen exprimiert wird. Nach Bindung des Antikörpers können die markierten Zellen in einem Magnetfeld entsprechend 3.7 isoliert werden. Zur Überprüfung des Verfahrens wurden von den angereicherten CD138+ Zellen der Patienten 5, 6 und 7 Zytospinpräparate angerfertigt, nach Pappenheim gefärbt und morphologisch beurteilt. Die Reinheit der CD138+ Fraktion lag dabei jeweils über 90%. Die Abbildung 3.15 zeigt ein exemplarisches Beispiel von Patient 7. Die Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 3.1.5 dargestellt.

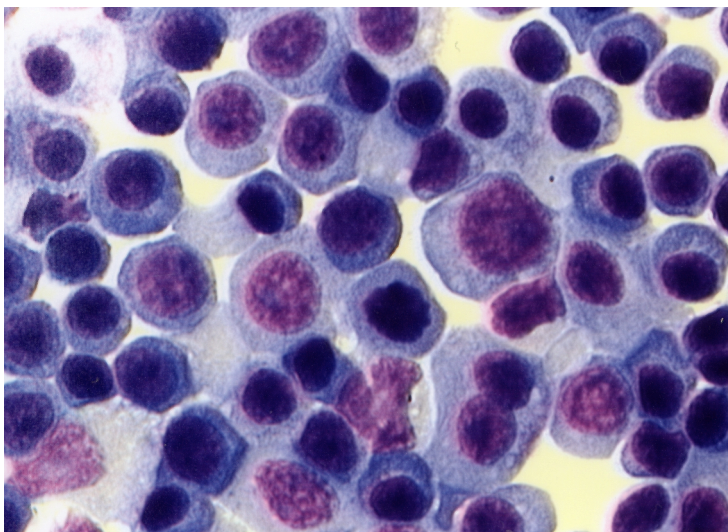


Abb. 3.15: Pappenheim Färbung der CD138+ Zellen von Patient 7 (siehe Tabelle 1).

Tabelle 3.15: Patientencharakteristika der Myelomzellspender. Mult.: mehr als eine Chemotherapie; HDSCT: Hochdosistherapie mit Stammzelltransplantation; MP: Melphalan/Prednisolon; Rad: Bestrahlung

Pat. #	Alter	Geschlecht	Stadium	Isotyp	Vortherapien
1	64	W	IIIA	IgG	Mult.
2	56	M	IIA	IgA	keine
3	60	W	IIIA	LK-lambda	Mult.+ HDSCT
4	70	W	IIIB	IgG	Rad.
5	39	W	IIIA	IgG	Mult.+ HDSCT
6	49	M	IA	LK-kappa	Rad
7	73	W	IIIA	IgG	MP

4. Ergebnisse

Dieser Abschnitt gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil der Ergebnisdarstellung soll zunächst auf das unterschiedliche Verhalten von Myelomzellen in Abwesenheit und Gegenwart von Knochenmarkstromazellen bezüglich Wachstum, Überleben und Medikamentenresistenz eingegangen werden. Dies geschieht unter besonderer Berücksichtigung des Zytokins Interleukin6, welches, wie bereits in der Einleitung dargestellt, als wichtiger Wachstums- und Apoptoseresistenzfaktor für das Multiple Myelom beschrieben ist. Deshalb wird besonders das Wachstum und Überleben von Myelomzellen unter IL-6 Rezeptorblockade mittels SANT7 untersucht. Die hier dargestellten Ergebnisse sind unter Hönemann et al. bereits publiziert worden [101]. Aus diesen Ergebnissen abgeleitete Folgearbeiten finden sich unter Chatterjee et al. [102].

Der zweite Teil der Ergebnisdarstellung beschreibt den Versuch einer Umsetzung der Idee der IL6 Rezeptorblockade als gentherapeutisches Konzept unter Anwendung eines retroviralen Gentransfersystems zur Transduktion der SANT7 c-DNA in Knochenmarkstromazellen.

4.1. Wachstum, Überleben und Medikamentenresistenz von Myelomzellen in Abwesenheit und Gegenwart von Knochenmarkstromazellen

4.1.1. Herstellung von rekombinantem SANT7mH, Wirkung auf INA-6 Zellen in Gegenwart von exogenem rekombinantem IL-6

Zur Durchführung der Experimente war es zunächst einmal notwendig rekombinantes SANT7 Protein in genügend grosser Menge herzustellen. Dies sollte in Anlehnung an ein bereits für IL-6 etabliertes Verfahren in E. coli geschehen, da bakterielle Expressionssysteme relativ einfach zu handhaben sind und in der Regel eine hohe Ausbeute an rekombinantem Protein versprechen.

Die Klonierung der SANT7 c-DNA erfolgte über mehrere Zwischenschritte mit Hilfe mutagener Primer mittels PCR und Standardverfahren der rekombinanten DNA-Technologie. Zunächst wurde aus der IL-6 sezernierenden Hodgkin Zelllinie HD-MyZ Komplet-RNA isoliert und eine c-DNA Synthese durchgeführt. Dann wurden mit Hilfe mutagener Primer verschiedene PCR

Reaktionen durchgeführt, wobei alle PCR Produkte SANT7 spezifische Mutationen gegenüber der wildtyp IL-6 c-DNA enthalten. Alle resultierenden Fragmente wurden in den Klonierungsvektor pGem-T EASY kloniert. Danach wurden sie sequenziert und zusammengefügt. Zur weiteren Vereinfachung der Produktion schien es hilfreich zusätzlich ein kombiniertes myc-His Tag als immunologische Erkennungssequenz C-terminal anzufügen. Diese Erkennungssequenz besteht zum Einen aus einem Nonamer-Peptid aus dem c-myc Protein, zum Anderen aus einem Peptid bestehend aus den Aminosäuren RGS und 6xHistidin. Das resultierende Konstrukt trägt deshalb den Namen SANT7mH. Mit Hilfe dieses Tags kann SANT7 theoretisch mit immunologischen Methoden von IL-6 z.B. in Zellkulturüberständen unterschieden werden. Weiterhin ist über die 6xHistidin Sequenz eine Proteinaufreinigung über eine Nickelchelatsäule möglich. Details zur Klonierung finden sich samt schematischer Darstellung in Abschnitt 3.1. Eine zur bakteriellen Expression modifizierte Variante der SANT7mH c-DNA wurde zusätzlich hergestellt. Hierbei musste die sogenannte eukaryontische Leadersequenz, die den gerichteten intrazellulären Proteintransport in eukaryontischen Zellen vermittelt, entfernt werden. Die verkürzte c-DNA wurde in den bakteriellen Expressionvektor pET 15b kloniert. Danach wurden 2 Liter Bakterienkultur (E. coli, Stamm BL-21) angesetzt, die Expressionsinduktion mit 1,5 μ M IPTG induziert. Nach 3,5h wurde die Kultur abzentrifugiert und mit einem Lysepuffer unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Danach erfolgte durch Zugabe von Nickel-Agarose die Bindung des Proteins. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde durch Inkubation mit Elutionspuffer das Protein aus der Nickelbindung gelöst. Nach erneuter Zentrifugation konnte das rekombinante SANT7mH aus dem Überstand in denaturierter Form gewonnen werden. Die Renaturierung zu funktionellem Protein erfolgte durch eine Zweischriddialyse: im ersten Schritt wurde gegen ein Redoxsystem aus oxidiertem und reduziertem Glutathion dialysiert, im zweiten Schritt gegen TRIS und Glycerin. Danach wurden durch Zentrifugation unlösliche Proteinaggregate abgetrennt, der Überstand nach Pierce vermessen und per SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Färbung und Western-Blot biochemisch analysiert (detaillierte Beschreibung in Abschnitt 3.2). Hierbei wurden durch Hinzufügen von Imidazol, beta-Mercaptoethanol und Triton X-100 die Bindungs- und Waschbedingungen sehr stringent gewählt. Somit wurde ein hoher Verlust von rekombinantem Protein zugunsten einer hohen Reinheit in Kauf genommen.

Entsprechend zeigte der Vergleich von unaufgereinigtem mit aufgereinigtem Bakterienlysats im SDS-Gel nach Coomassie-Färbung eine gute Effektivität der Reinigungsprozedur, sowie darüberhinaus das erwartete apparente Molekulargewicht des eluierten SANT7mH Proteins

(Abb. 4.1.1.1). Der hohe Verlust von rekombinantem SANT7mH durch die stringenten Bindungsbedingungen dokumentiert sich in form einer starken Bande für SANT7mH in Linie 2. Hierdurch wurde tatsächlich eine hohe Reinheit des eluierten Proteins erreicht, da in Linie 5 ausser SANT7mH kein kontaminierendes Protein angefärbt wurde.

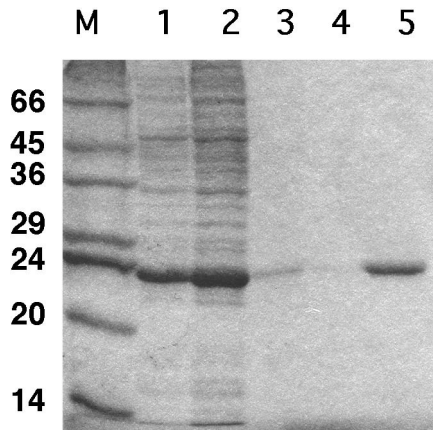


Abb. 4.1.1.1: SDS-PAGE (12,5%) und Coomassie Färbung von 20µl verschiedener Fraktionen aus der SANT7mH Präparation

M Marker, 1 Bakterienlysat, 2 Überstand nach Bindung an Nickelagarose, 3 + 4 Waschfraktionen, 5 Eluat.

Die weitere Überprüfung der Identität und Integrität des Proteins und der C-terminalen Erkennungspeptide erfolgte per Western-Blotting. Hierbei kamen gegen IL-6, das c-myc und das Histidin-Tag gerichtete Antikörper zum Einsatz (Abb. 4.1.1.2). Da mit allen drei Antikörpern eine spezifische Färbung erzielt werden konnte, kann man von der erhaltenen Integrität des Moleküls und der angefügten Erkennungssequenzen ausgehen. Die erheblich schwächere Bande nach Färbung mit dem anti-6xHis Antikörper erklärt sich am ehesten durch die bekanntermassen niedrige Affinität dieses Antikörpers. Da das Protein nach Dialyse und abschliessender Zentrifugation in 50ml mit in einer Konzentration von 0,45µg/µl Puffer vorlag konnte aus 2 Litern Bakterienkultur also 22,5mg gereinigtes SANT7mH gewonnen werden.

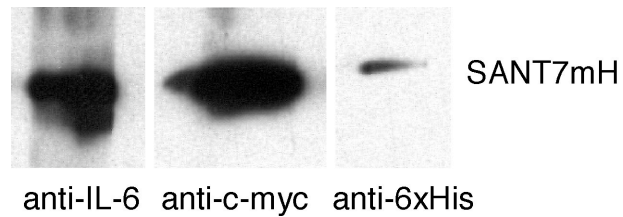


Abb. 4.1.1.2: Nachweis des SANT7mH Proteins

Western-Blot von 500ng des aufgereinigten SANT7mH Proteins und Färbung mit 3 verschiedenen murinen Antikörpern: anti-IL-6, anti-c-myc, anti-6xHistidin, sowie Nachweis mittels eines Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Maus F(ab)₂ Fragmentes und ECL.

Die funktionelle Testung des rekombinanten SANT7mH per Proliferationsassay wurde im Vergleich zu HPLC-gereinigtem (unmarkiertem) SANT7 (erhalten von Dr. R. Savino, IRBM, Rom) an der Zelllinie INA-6 durchgeführt. Hierbei zeigt sich zunächst die IL-6 Abhängigkeit der INA-6 Zellen als sigmoider Anstieg der Proliferation bei steigenden IL-6 Konzentrationen. Diese Proliferation konnte durch 250 ng/ml SANT7 bzw. SANT7mH in nahezu identischer Weise inhibiert werden. Diese Inhibition konnte jedoch durch höchste IL-6 Konzentrationen (20 ng/ml) vollständig aufgehoben werden, was die Spezifität der durch SANT7 und SANT7mH induzierten Wachstumshemmung aufzeigt (Abb. 4.1.1.3 A). In einem weiteren Assay wurde bei konstanter IL-6 Konzentration (100 pg/ml) die SANT7 bzw. SANT7mH Konzentration titriert (Abb. 4.1.1.3 B). In beiden Assays lässt sich der aus der Literatur bekannte inhibitorische Effekt von SANT7 auf IL-6 abhängige Myelomzellen für beide Proteine nahezu identisch mit einem halbmaximalen Effekt bei einem 100-fachen molaren Überschuss von SANT7 bzw. SANT7mH (bei nahezu identischem Molekulargewicht beider Moleküle) über IL-6 reproduzieren.

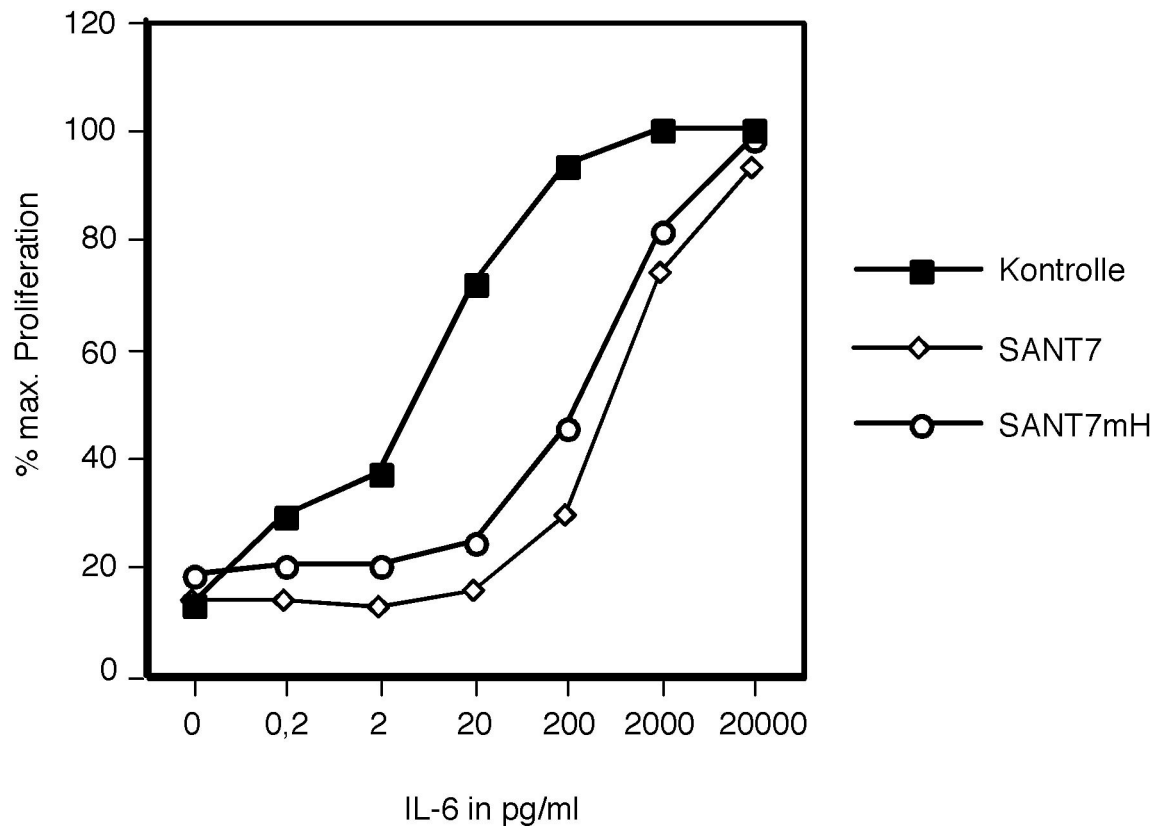


Abb. 4.1.1.3 A: Proliferationsassay der INA-6 Zelllinie (Alamar Blue Methode)

Inkubation mit steigenden Konzentrationen von IL-6 (x-Achse) in Abwesenheit und Gegenwart von 250ng/ml SANT7 bzw. SANT7mH. Die Proliferation ist angegeben als prozentualer Anteil der maximalen Proliferation ohne SANT7 bzw. SANT7mH.

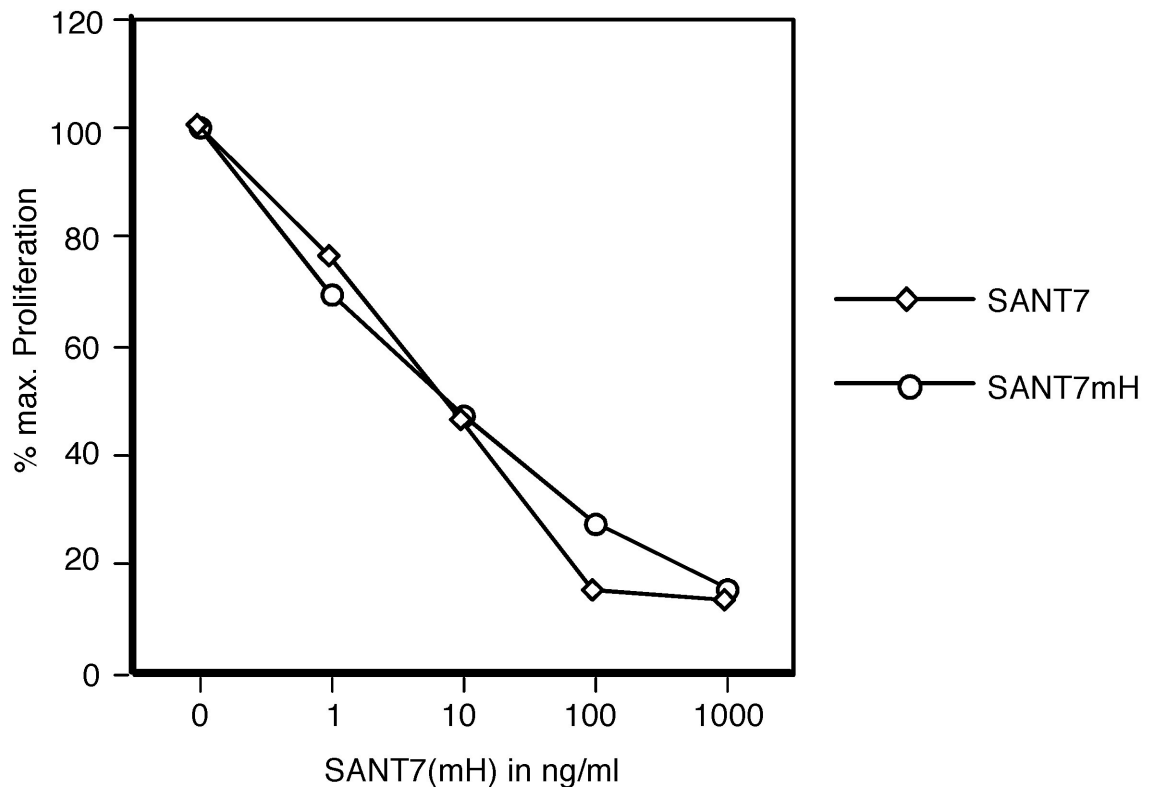


Abb. 4.1.1.3 B: Proliferationsassay der INA-6 Zelllinie

Inkubation mit steigenden Konzentrationen von SANT7 bzw. SANT7mH bei einer IL-6 Konzentration von 100pg/ml. Die Proliferation ist angegeben als prozentualer Anteil der maximalen Proliferation ohne SANT bzw. SANT7mH. In beiden Assays führt ein 100-facher molarer Überschuss von SANT7(mH) zu einer ca. 50%-igen Inhibition der Proliferation. Die Messung erfolgte in 3-er Bestimmungen, die Standardabweichung ist grafisch nicht sichtbar.

Als Kontrolle zum Ausschluss unspezifischer Toxizität z.B. durch bakterielle Toxine wurde die T-Zelllinie Jurkat mitgeführt, die den IL-6 Rezeptor nicht exprimiert und demzufolge IL-6 unabhängig wächst. Hierbei ergab sich selbst bei hohen SANT7mH Konzentrationen (50µg/ml) keine Proliferationsänderung und somit kein Anhalt für unspezifische Toxizität z.B. durch verbliebene bakterielle Toxine (nicht gezeigt).

Zur weiteren Spezifitätskontrolle des modifizierten SANT7 Proteins wurden Signaltransduktionsanalysen durchgeführt. IL-6 führt, wie im einleitenden Abschnitt 1.1.4 genauer dargestellt, zu einer Aktivierung des Jak-STAT Signalweges mit vorrangiger Aktivierung von STAT-3. Nach Aktivierung von STAT-3 über den IL-6 Rezeptor und Janus-Kinasen (Jak) kommt es zu konsekutiver Phosphorylierung des Tyrosinrestes an Position 705 des STAT-3 Moleküls. Nach nachfolgender Translokation in den Zellkern agiert STAT-3 dort als Transkriptionsfaktor für unterschiedliche Zielgene, darunter einige antiapoptotische

Gene wie z.B. bcl_x_L [54]. Konsequenterweise hatte die Applikation des SANT7mH Proteins erwartungsgemäss eine starke Abnahme der STAT-3 Tyrosinphosphorylierung an Position 705 von IL-6 stimulierten INA-6 Zellen zur Folge. Eine geringe Restaktivierung ist im Vergleich zu völliger IL-6 Depletion (Linie 1) noch sichtbar, führt aber wie in Abb. 4.1.1.3 gezeigt nicht zu einer Proliferationsaktivität über das Kontrollniveau ohne IL-6 hinaus. Die effektive Herunterregulation der STAT-3 Aktivierung durch SANT7mH Applikation belegt zusätzlich die spezifische Inhibition des IL-6 Signalweges durch SANT7mH durch Blockade des IL-6 Rezeptors (Abb 4.1.1.4).

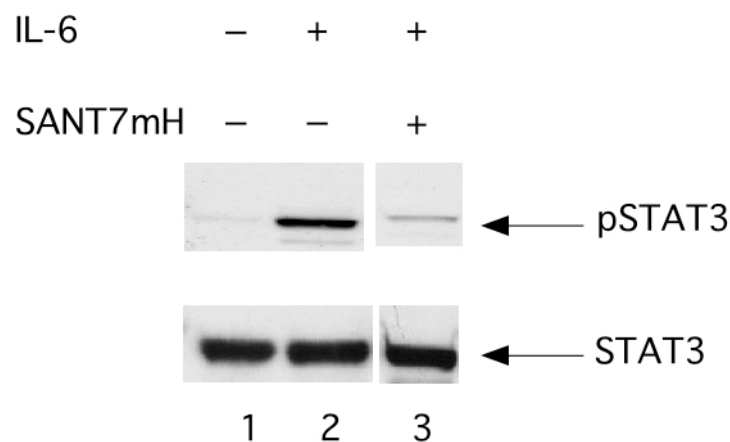


Abb. 4.1.1.4: Nachweis der STAT-3 Phosphorylierung

Western Blot von Zellysaten unstimulierter und IL-6 stimulierter INA-6 Zellen in Abwesenheit bzw. Gegenwart von SANT7mH nach 12h Inkubation. Gefärbt wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes STAT3 bzw. einem Antikörper gegen unphosphoryliertes STAT3 als Ladekontrolle. Der Bindungsnachweis erfolgte mittels eines Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Maus $F(ab)_2$ Fragmentes und ECL. 1: unstimulierte INA-6 (12h IL-6 Entzug), 2: INA-6 +2ng/ml IL-6, 3: INA-6 +2ng/ml IL-6 + 50µg/ml SANT7mH.

Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass erstens das gewählte Aufreinigungsprotokoll in der Lage ist SANT7mH Protein in ausreichender Menge und Reinheit zu liefern und zweitens, dass die C-terminal angefügten Aminosäuren die Funktion des Proteins im Vergleich zu unmodifiziertem SANT7 nicht beeinträchtigen.

4.1.2. Wirkung von SANT7mH auf INA-6 in Gegenwart der humanen Stromazelllinie HS-5

Bevor die Frage nach dem Effekt von transduzierten, d.h. SANT7mH produzierenden Stromazellen auf das Wachstum von Myelomzellen beantwortet werden konnte, mussten zunächst Daten über das Verhalten von Myelomzellen in Kokulturen mit unmodifizierten KMSZ in Gegenwart und Abwesenheit von rekombinantem SANT7mH gewonnen werden. Hierzu wurde in einem Kokulturassay mit der humanen Stromazelllinie HS-5 die Wirkung von rekombinantem SANT7mH auf INA-6 Zellen hinsichtlich Proliferation und der Induktion von Zelltod untersucht. Hierbei zeigte sich zunächst, dass wie erwartet durch die Kokultur exogenes IL-6 nicht mehr für das Überleben der INA-6 Zellen benötigt wird, da konditioniertes Medium von HS-5 Zellen (semikonfluent, 7d Kultur) über 2ng/ml IL-6 enthält [98]. Entsprechend konnte durch Hinzufügen von hochdosiertem SANT7mH (50µg/ml) die Proliferation der INA-6 Zellen auf 35% des Kontrollniveaus reduziert werden (Abb. 4.1.2.1). Dies spiegelt sich auch in einer nahezu identischen Reduktion überlebender Zellen auf 36% im Annexin-V/PI Assay (detaillierte Beschreibung Abschnitt 3.12) zur Messung von Apoptose bzw. Zellviabilität wider (Abb. 4.1.2.2). Allerdings fällt bei diesen Experimenten bereits auf, dass Wachstum und Überleben von INA-6 Zellen auch durch die sehr hohe Konzentration von 50µg/ml SANT7mH in Gegenwart von HS-5 Zellen nicht mehr vollständig inhibiert werden kann und 1µg/ml SANT7mH keinen Einfluss auf Wachstum und Überleben der INA-6 Zellen in diesem System hat.

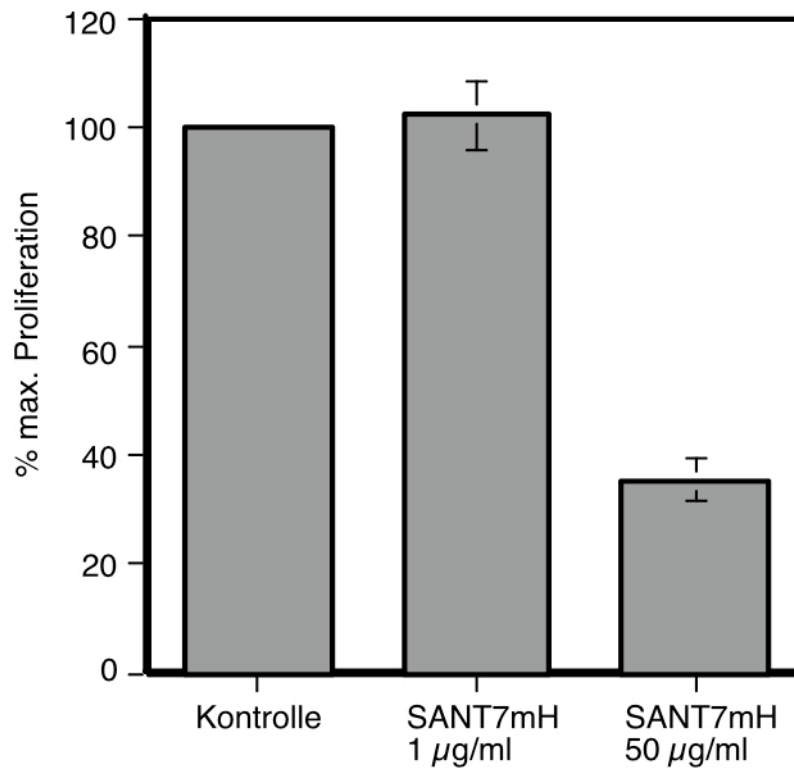


Abb. 4.1.2.1: Proliferationsassay (Alamar Blue Methode) von kokultivierten INA-6 Zellen

1×10^5 INA-6 Zellen nach 3 Tagen Kokultur mit HS-5 Zellen (1×10^4) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von SANT7mH. Auswertung von zwei unabhängigen Experimenten mit Triplikaten. Die Proliferation ist angegeben als prozentualer Anteil der maximalen Proliferation ohne SANT7mH (Kontrolle).

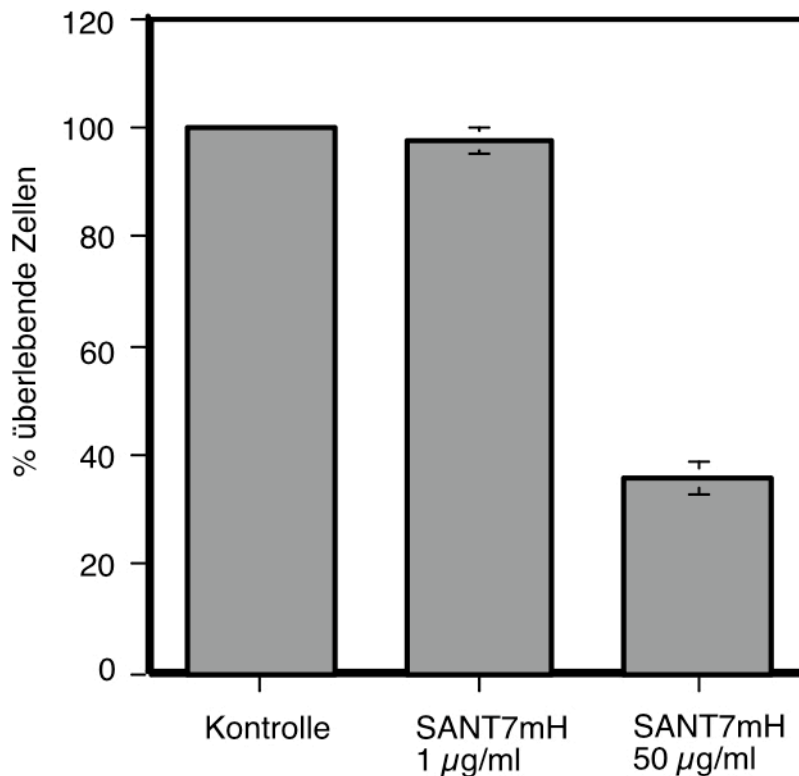


Abb. 4.1.2.2: Annexin-V/PI Assay von kokultivierten INA-6 Zellen

1×10^5 INA-6 Zellen nach 3 Tagen Kokultur mit HS-5 Zellen (1×10^4) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von SANT7mH. Auswertung von zwei unabhängigen Experimenten. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil verbliebener lebender Zellen (Annexin-V und PI negativ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100%).

4.1.3. Wirkung von SANT7mH auf INA-6 in Gegenwart von primären KMSZ

Um die Übertragbarkeit der mit den HS-5 Zellen erzielten Ergebnisse auf primäre Stromazellen zu überprüfen wurden dann Kokultorexperimente mit INA-6 Zellen in Gegenwart primärer Stromazellen durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass wie erwartet primäre Stromazellen Wachstum und Überleben der Myelomzelllinie ohne Hinzugabe von zusätzlichem exogenem IL-6 vermitteln können. Darüberhinaus zeigte sich in diesem System sogar eine noch ausgeprägtere Resistenz der INA-6 Zellen gegenüber IL-6 Rezeptorblockade mittels SANT7mH. Dies wurde wiederum sowohl durch Proliferationsassays als auch Annexin-V/PI Assays dokumentiert. Im Proliferationsassay wurde durch $1 \mu\text{g/ml}$ SANT7mH eine Reduktion des Wachstums auf 81% des Kontrollniveaus erreicht, durch hochdosiertes SANT7mH auf 59% (Abb. 4.1.3.1). Dies steht deutlich im Gegensatz zu den in Abb. 4.1.1.3 gezeigten Daten zur Proliferation von INA-6

Zellen in Gegenwart von exogenem IL-6 mit nahezu vollständiger Inhibition der Proliferation durch SANT7mH.

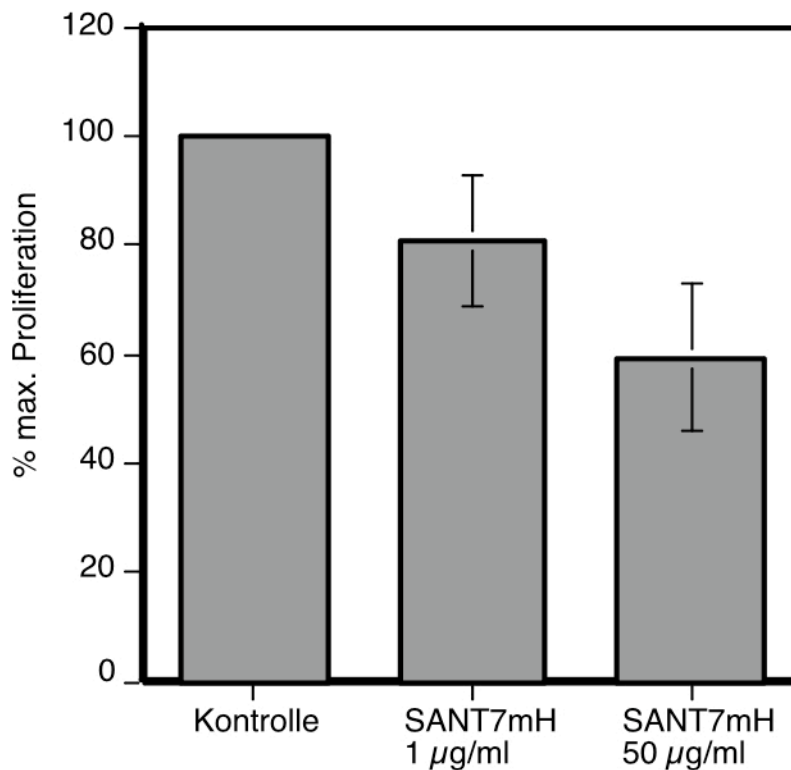


Abb. 4.1.3.1: Proliferationsassay (Alamar Blue Methode) von kokultivierten INA-6 Zellen

1×10^5 INA-6 Zellen nach 3 Tagen Kokultur mit primären KMSZ (1×10^4) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von SANT7mH. Auswertung von drei unabhängigen Experimenten mit Triplikaten. Die Proliferation ist angegeben als prozentualer Anteil der maximalen Proliferation ohne SANT7mH (Kontrolle).

In der Messung überlebender Zellen war in Gegenwart hoher Dosen SANT7mH ($50 \mu\text{g/ml}$) nach 3 Tagen im Mittel nur eine Reduktion der Viabilität der INA-6 Zellen auf 68% des Kontrollniveaus messbar, durch $1 \mu\text{g/ml}$ SANT7mH konnte eine Reduktion auf 88% erreicht werden (Abb 4.1.3.2). Um herauszufinden ob diese Resistenz etwa durch extrem hohe IL-6 Konzentrationen und somit nicht ausreichende SANT7mH Menge in den Kokulturen begründet ist, wurden die IL6 Konzentrationen in zwei unabhängigen Kokulturen per ELISA gemessen. Diese betrug 702 bzw. 897 pg/ml, sodass aufgrund der eingesetzten Menge von SANT7mH von einer nahezu vollständigen Blockade der IL-6 Rezeptoren ausgegangen werden kann, ohne dass dies eine adäquate Reduktion der Proliferation bzw. Viabilität der INA-6 zur Folge hatte.

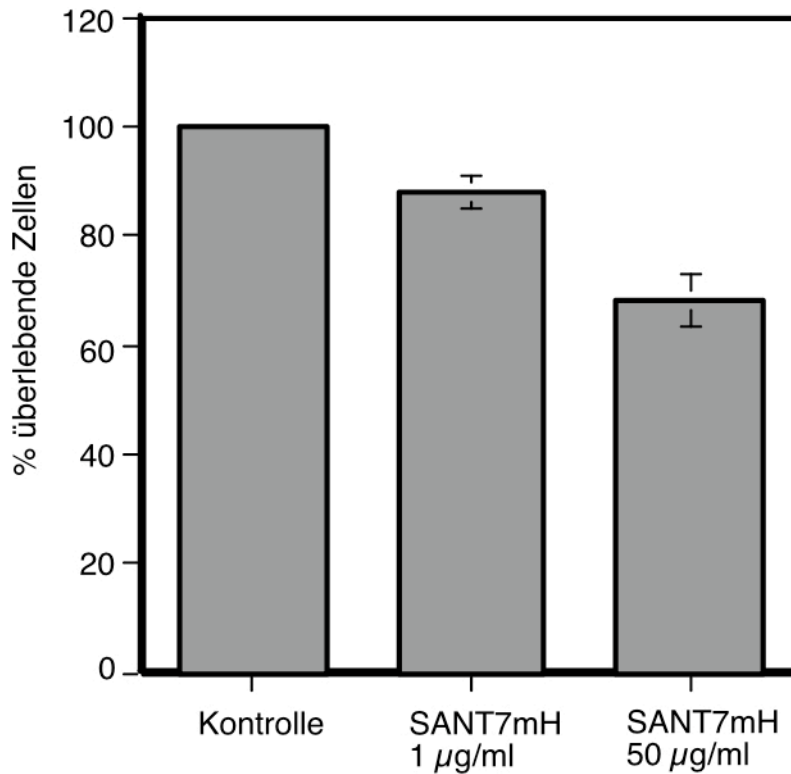


Abb. 4.1.3.2: Annexin-V/PI Assay von kokultivierten INA-6 Zellen

1×10^5 INA-6 Zellen nach 3 Tagen Kokultur mit primären KMSZ (1×10^4) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von SANT7mH. Auswertung von drei (SANT7mH 1 µg/ml) bzw. zwei (SANT7mH 50 µg/ml) unabhängigen Experimenten. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil verbliebener lebender Zellen (Annexin-V und PI negativ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100%).

4.1.4. Wirkung von SANT7mH auf primäre Myelomzellen in Gegenwart von primären KMSZ

Nach diesen Ergebnissen wurde dann die Frage nach der Wirksamkeit von rekombinantem SANT7mH auf primäre Myelomzellen in Kokultur mit primären KMSZ gestellt. Proliferationsassays wurden aufgrund der niedrigen proliferativen Aktivität primärer Myelomzellen nicht durchgeführt. Die Abbildung 4.1.4.1 zeigt die Ergebnisse von Annexin-V/PI Assays, die mit aufgereinigten Myelomzellen von 4 Spendern erzielt wurden. Hierzu wurden Knochenmarkaspirate der Myelompatienten über die Expression des CD138 (Syndecan-1) Moleküls mit Hilfe paramagnetischer Beads aufgereinigt und in die Kulturen eingesetzt. In den Kokulturen zeigt sich ein einheitliches Bild völliger Resistenz von kokultivierten primären Myelomzellen gegenüber Blockade des IL-6 Rezeptors durch hochdosiertes SANT7mH (50 µg/ml). Demgegenüber konnte in Gegenwart von 2 ng/ml exogenem IL-6 eine

Reduktion der Viabilität der Myelomzellen durch SANT7mH auf im Mittel 39% im Vergleich zum Beginn der Kultur bzw. 52% im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle dokumentiert werden. In den unbehandelten Kontrollen war die Viabilität der Myelomzellen nach 7 Tagen mit im Mittel 76% für mit IL-6 kultivierte bzw. 80% für kokultivierte Zellen nahezu identisch.

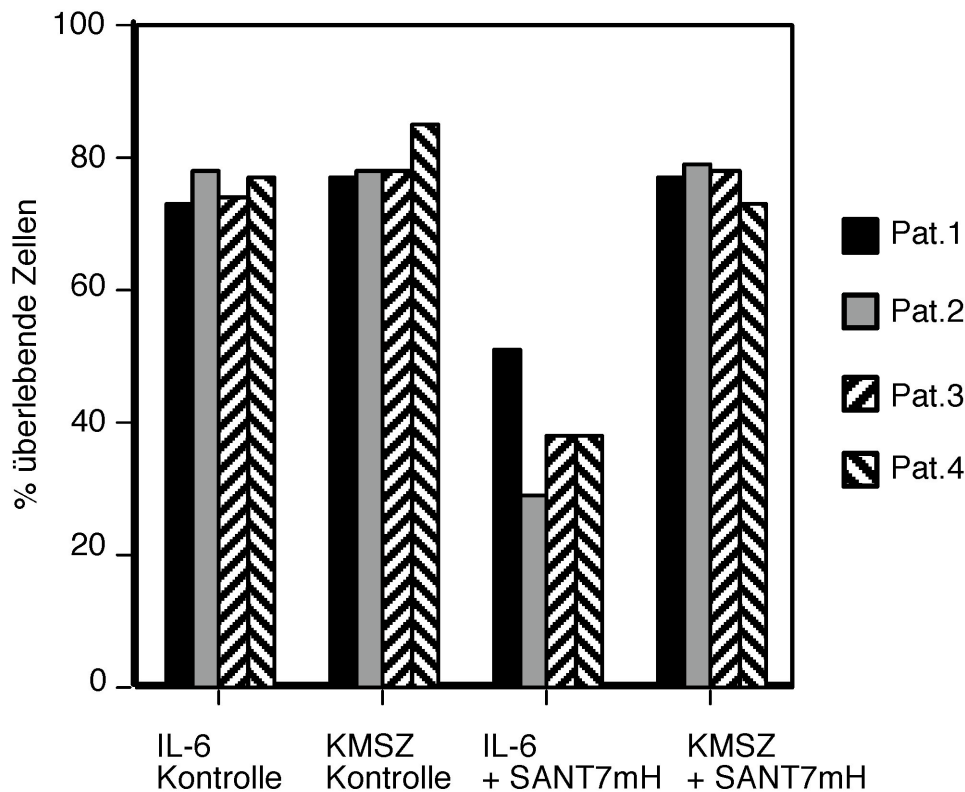


Abb. 4.1.4.1: Annexin-V/PI Assay von primären CD138-positiven Myelomzellen

1×10^5 primäre MM Zellen von 4 verschiedenen Spendern nach 7 Tagen Kultur mit 2ng/ml IL-6 oder Kokultur mit primären KSMZ (1×10^4) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 50 μ g/ml SANT7mH. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil verbliebener lebender Zellen (Annexin-V und PI negativ) nach Beendigung der Kultur.

4.1.5. Beeinflussung der Medikamentenresistenz von kokultivierten Myelomzellen durch SANT7

Da SANT7mH in diesem System offensichtlich keinen Einfluss auf das Überleben von primären Myelomzellen hat, stellte sich die Frage ob SANT7mH in der Lage ist die Medikamentenresistenz von Myelomzellen zu beeinflussen. Hierzu wurden zwei Substanzen ausgewählt: 1. das Glucocorticoid Dexamethason, wichtiger Bestandteil der

Standardtherapien des Myeloms, 2. All-Trans Retinolsäure, die v.a. in experimentellen Systemen in der Lage ist Apoptose in Myelomzellen zu induzieren aber bis jetzt keinen Eingang in die klinische Anwendung beim Myelom fand[103, 104]. Zunächst wurde wiederum im Zelllinienmodell mit den INA-6 Zellen auf primären KMSZ gearbeitet. Im Proliferationsassay zeigte sich eine deutliche Resistenz von INA-6 Zellen gegenüber Dexamethason aber eine gute Empfindlichkeit gegen ATRA (Inhibition der Proliferation auf 95% bzw. 62% der unbehandelten Kontrolle entsprechend einer Reduktion um 5% vs. 38%). SANT7mH (1µg/ml) hatte wie bereits in Abb. 4.1.3.1 gezeigt mit Inhibition der Proliferation auf 81% nur mässige Wirksamkeit. Durch Kombinationen mit SANT7mH konnte jedoch eine deutlich stärkere Inhibition der Proliferation erreicht werden (Dex + SANT7 57%, ATRA + SANT7mH 13% der Kontrolle). Die stärkste Wirkung ging von der Kombination aller drei Substanzen aus (Inhibition der Proliferation auf 8% der Kontrolle) (Abb. 4.1.5.1).

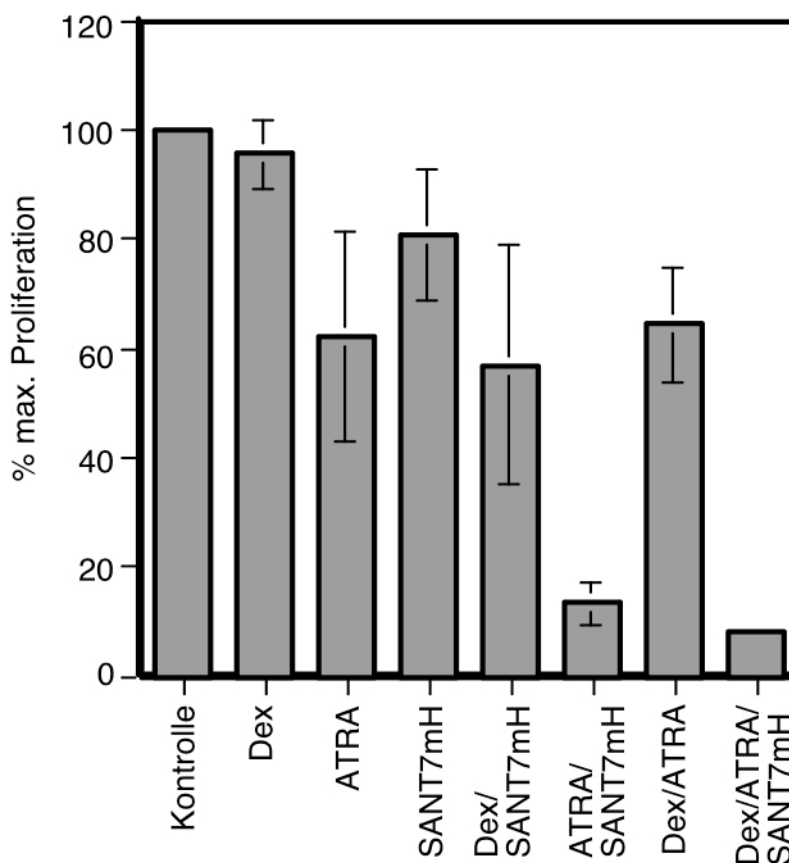


Abb. 4.1.5.1: Proliferationsassay (Alamar Blue Methode) von kokultivierten INA-6 Zellen

1x10⁵ INA-6 Zellen nach 3 Tagen Kokultur mit primären KMSZ (1x10⁴) in Gegenwart von 10µM Dex, 1µM ATRA und 1µg/ml SANT7mH bzw. deren Kombinationen. Auswertung von drei unabhängigen Experimenten mit Triplikaten. Die Proliferation ist angegeben als prozentualer Anteil der maximalen

Proliferation (unbehandelte Kontrolle, 100%).

Im nächsten Schritt wurde dann wiederum die durch diese Substanzkombinationen ausgelöste Reduktion der Zellviabilität gemessen. Hier ergaben sich qualitativ ähnliche Ergebnisse wie im Proliferationsassay. Allerdings zeigte sich, dass für alle getesteten Substanzen und deren Kombinationen die Reduktion der Zellviabilität geringer ausgeprägt war als die Reduktion der Proliferation. So resultiert aus der Kombination aller drei Testsubstanzen wie erwähnt eine Reduktion der Proliferation auf 8% des Kontrollniveaus, jedoch nur eine Reduktion der Viabilität auf 39% der Kontrolle (Abb. 4.1.5.2).

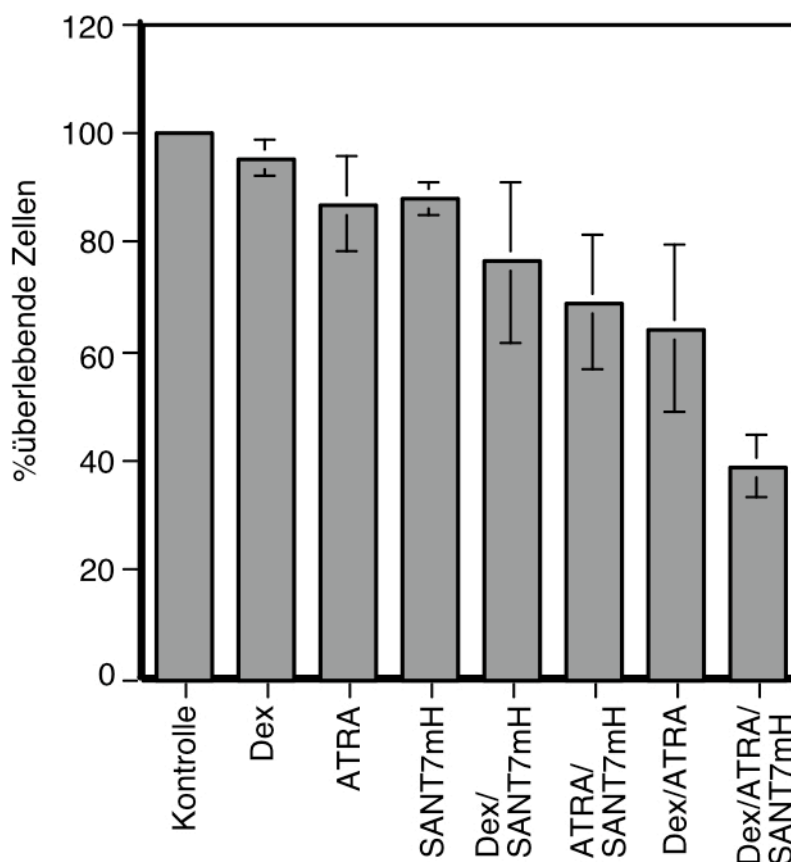


Abb. 4.1.5.2: Annexin-V/PI Assay von kokultivierten INA-6 Zellen

1×10^5 INA-6 Zellen nach 3 Tagen Kokultur mit primären KMSZ (1×10^4) in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ Dex, $1 \mu\text{M}$ ATRA und $1 \mu\text{g/ml}$ SANT7mH bzw. deren Kombinationen. Auswertung von drei unabhängigen Experimenten. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil verbliebener lebender Zellen (Annexin-V und PI negativ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100%).

Um diese quantitative Diskrepanz aufzuklären wurden durchflusszytometrisch modifizierte

Zellzyklusanalysen durchgeführt. Diese messen den DNA Gehalt der Zellen, der zellzyklusabhängig unterschiedlich ist und stellen ihn als Histogramm dar. So besitzen Zellen in der G2 und M Phase den doppelten Chromosomensatz und haben somit einen deutlich höheren DNA Gehalt als Zellen in der G1 oder G0 Phase. Darüberhinaus lässt sich ein sogenannter sub-G1 Anteil abgrenzen, der letztlich Zellen mit niedrigerem DNA Gehalt darstellt. Dieser Zustand findet sich bei Prozessen, bei denen es zu DNA Fragmentation kommt, ein Vorgang der v.a. bei apoptotischen Zellen einsetzt. Somit repräsentiert der sub-G1 Gipfel im DNA Histogramm letztlich apoptotische Zellen. Mit Hilfe dieser Analyse kann bestimmt werden ob die beobachtete Inhibition der Proliferation der INA-6 Zellen auf einem Zellzyklusstopp oder Apoptose beruht. Es zeigt sich v.a. für ATRA ein signifikanter Effekt im Sinne eines Zellzyklusarrests in der G1 Phase. Durch Hinzugabe von Dex erhöhte sich demgegenüber v.a. der (apoptotische) sub-G1 Anteil, durch weitere Hinzugabe von SANT7mH wurden sowohl der sub-G1 als auch der G1 Anteil nochmals erhöht (68%) (Abb. 4.1.5.3).

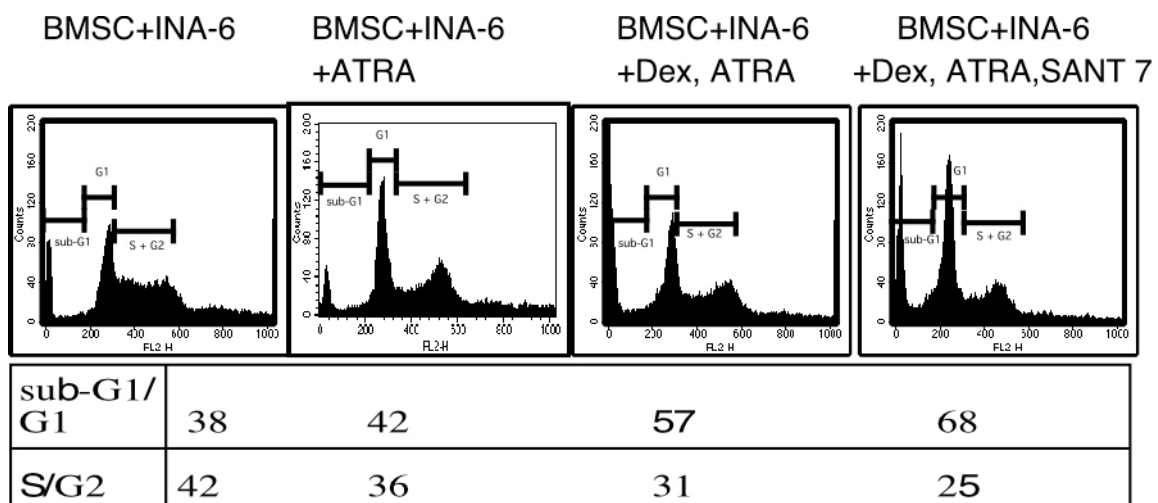


Abb. 4.1.5.3: Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse von kokultivierten INA-6 Zellen

1×10^5 INA-6 Zellen nach 3 Tagen Kokultur mit primären KMSZ (1×10^4) in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ Dex, $1 \mu\text{M}$ ATRA und $1 \mu\text{g/ml}$ SANT7mH bzw. deren Kombinationen. Die Prozentangaben in der Tabelle geben den Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase (sub-G1/G1, G2/M) an.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Kombination aus Dex, ATRA und SANT7 in der Lage ist die Proliferation der INA-6 Zellen in Gegenwart von KMSZ deutlich zu inhibieren. Dieser Effekt ist das Resultat sowohl von einer Apoptoseinduktion als auch eines Zellzyklusarrests. Im nächsten Schritt wurde dann wiederum überprüft, ob sich diese Ergebnisse auf primäre

Myelomzellen übertragen lassen. Es wurden CD138 positive Zellen von 3 Spendern mit Kombinationen der 3 verwendeten Substanzen per Annexin-V/PI Assay analysiert. Es zeigte sich, dass bei primären Myelomzellen in Gegenwart von primären KMSZ nur die Kombination aus Dex, ATRA und SANT7mH in der Lage war eine signifikante Reduktion der Viabilität der Myelomzellen zu induzieren (im Mittel auf 50% absolut, dies entspricht 62% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) (Abb. 4.1.5.4). Aufgrund der niedrigen proliferativen Aktivität primärer Myelomzellen wurden wiederum keine Proliferationsassays durchgeführt.

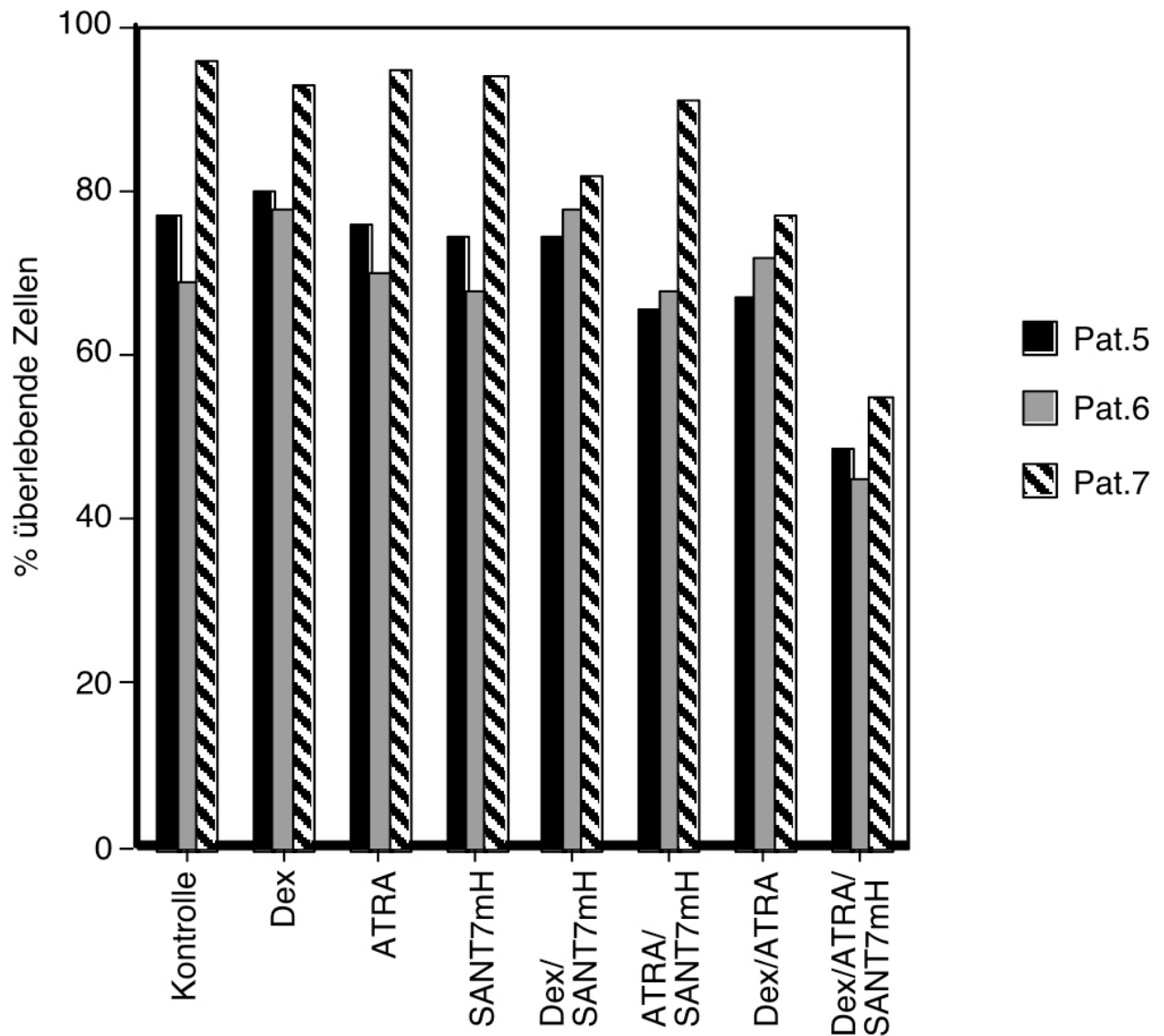


Abb. 4.1.5.4: Annexin-V/PI Assay von kokultivierten primären CD138-positiven Myelomzellen

1×10^5 primäre MM Zellen von 3 verschiedenen Spendern nach 7 Tagen Kokultur mit primären KSMZ (1×10^4) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von $10 \mu\text{M}$ Dex, $1 \mu\text{M}$ ATRA und $1 \mu\text{g/ml}$ SANT7mH bzw. deren Kombinationen. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil verbliebener lebender Zellen (Annexin-V und PI negativ) nach Beendigung der Kultur.

4.2. IL-6 Rezeptorblockade als gentherapeutisches Konzept unter Anwendung eines eines retroviralen Gentransfersystems in Knochenmarkstromazellen.

4.2.1. Transduktion der humanen Stromazelllinie HS-5 mit dem MgSLS7mH Vektor

Ausgehend von dem Gedanken das SANT7 bzw. SANT7mH Molekül zur Therapie des Myeloms zu verwenden wurde parallel zu den im ersten Abschnitt des Ergebnisteils beschriebenen Arbeiten die Idee einer gentherapeutischen Anwendung verfolgt. Ziel war die Konstruktion eines retroviralen Gentransfersystems zur Transduktion der SANT7mH c-DNA in Knochenmarkstromazellen. Hierzu wurde der bereits in einer klinischen Studie im Einsatz befindliche Vektor MgSLdS herangezogen [99, 100]. Als Selektionsmarker für transduzierte Zellen dient in diesem System eine intrazellulär trunke Variante des Nerve Growth Faktor Rezeptors (dNGFR). Dieser wird durch alternatives Splicing aus einer gemeinsamen Messenger-RNA mit SANT7mH generiert. Mit Hilfe dieses Systems wurden die beiden retroviralen Konstrukte MgSLS7mH und MgSLdS als Kontrollvektor hergestellt (detaillierte Beschreibung in Abschnitt 3.5). Mit diesen Vektoren wurde dann die humane Stromazelllinie HS-5 an 2 aufeinanderfolgenden Tagen transduziert. Dabei konnte die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch anhand des zusätzlich als Transgen exprimierten membranständigen trunke NGFR (dNGFR) bestimmt werden und lag zunächst bei 20% für den Kontrollvektor bzw. 43% für MgSLS7mH (nicht gezeigt). Die resultierenden Zellen wurden entsprechend HS-5-MgSLdS bzw. HS-5-MgSLS7mH benannt.

Daraufhin erfolgte eine zweimalige Anreicherung dNGFR positiver Zellen über MACS-Partikel. Danach fanden sich in der Kultur nahezu 100% dNGFR positive Zellen mit starker Transgenexpression sowohl für HS-5-MgSLdS als auch für HS-5-MgSLS7mH, wobei die dNGFR Expression für den Kontrollvektor etwa eine Grössenordnung über HS-5-MgSLS7mH lag (Abb. 4.2.1.1). Diese Transgenexpression war stabil für mindestens zwei Monate nachweisbar (nicht gezeigt).

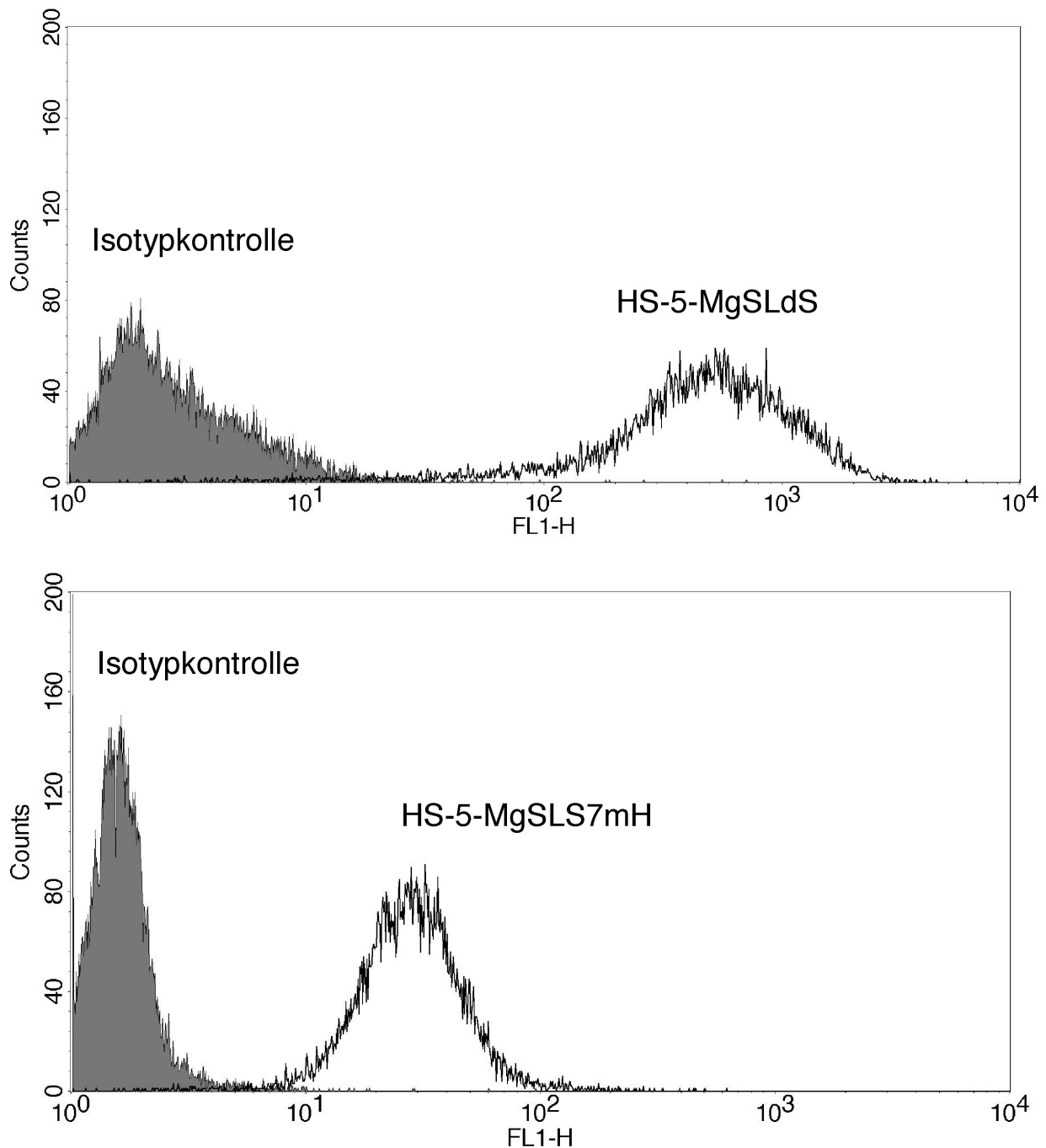


Abb. 4.2.1.1: Durchflusszytometrische Messung der Transgenexpression (dNGFR) von HS-5 Zellen

Durchflusszytometrische Messung der Transgenexpression (dNGFR) von HS-5 Zellen nach zweimaliger Anreicherung über paramagnetische "Beads". Der Nachweis erfolgte über Färbung mit einem murinem anti-dNGFR Antikörper mit einem FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus F(ab)₂ Fragment als Detektionsantikörper. Als Negativkontrolle (ausgefüllte Kurve) diente ein unspezifischer muriner Antikörper gleichen Isotyps. Beide Zelllinien (HS-5-MgSLdS und HS-5-MgSLS7mH) zeigen zu nahezu 100% eine deutliche dNGFR Expression.

Um zu überprüfen ob neben der dNGFR auch eine SANT7mH Expression stattfand, wurde ein Expressionsnachweis auf m-RNA Ebene per RT-PCR durchgeführt (Abb. 4.2.1.2). Hierbei wurden die PCR Primer so gewählt, das der 5`Primer im Bereich des SANT7mH liegt. Um eine unerwünschte reverse Transkription und Amplifikation der ebenfalls exprimierten wildtyp IL-6 m-RNA zu verhindern wurde der 3`Primer in den transkribierten aber untranslatierten Vektorbereich 3` der SANT7mH c-DNA verlegt. Das aus dieser Primerwahl resultierende Amplifikat ist somit hochspezifisch für das vorliegende Konstrukt und weist eine Grösse von 618 Basenpaaren auf (Schema hierzu siehe Abb. 3.5). Die Kontrollansätze mit untransduzierten HS-5 Zellen bzw. HS-5-MgSLd zeigen entsprechend kein Amplifikat, da in diesen Zellen keine SANT7mH c-DNA als Transgen vorliegt. Als Kontrolle der c-DNA Integrität wurden für alle c-DNA Präparationen zusätzlich Amplifikationen des ubiquitär exprimierten beta-2Mikroglobulins durchgeführt. Ebenfalls wurde für alle Ansätze eine Amplifikation der m-RNA Präparation durchgeführt um Artefakte durch Kontamination mit genomischer DNA auszuschliessen. Als zusätzliche Kontaminationskontrolle der verwendeten Substanzen diente eine Amplifikation ohne c-DNA oder m-RNA.



Nr	Zellen	Template	Primer
1	HS-5	c-DNA	MgSLS7mH
2	HS-5-MgSLdS	c-DNA	MgSLS7mH
3	HS-5-MgSLS7mH	c-DNA	MgSLS7mH
4	HS-5	c-DNA	beta-2-MG
5	HS-5-MgSLdS	c-DNA	beta-2-MG
6	HS-5-MgSLS7mH	c-DNA	beta-2-MG
7	HS-5-MgSLS7mH	m-RNA	MgSLS7mH
8	HS-5	m-RNA	beta-2-MG
9	HS-5-MgSLdS	m-RNA	beta-2-MG
10	HS-5-MgSLS7mH	m-RNA	beta-2-MG
11	H ₂ O	H ₂ O	MgSLS7mH
12	H ₂ O	H ₂ O	beta-2-MG

Abb. 4.2.1.2: RT-PCR zum Expressionsnachweis von SANT7mH in HS-5 Zellen

RT-PCR nach m-RNA-Präparation und c-DNA Synthese von untransduzierten und transduzierten HS-5 Zellen mit spezifischen Primerpaaren zum Expressionsnachweis von SANT7mH (618 Bp) und humanem beta-2-Mikroglobulin (γ bp) als Kontrolle. M: DNA-Marker, Fragmentgrösse in Basenpaaren (Bp), Beschreibung der einzelnen Spuren siehe Tabelle.

4.2.2. Überleben von INA-6 Zellen auf transduzierten HS-5

Analog zu den Experimenten in 4.1.2 wurden nun mit den transduzierten HS-5 Zellen erneut Kokulturen mit den INA-6 Zellen durchgeführt und hinsichtlich Überleben der INA-6 Zellen untersucht. Hier zeigte sich ein deutlicher Einfluss der SANT7mH Expression der HS-5-MgSLS7mH Zellen, da im Vergleich zur HS-5-MgSLdS Kontrolle bereits ohne zusätzliches exogenes SANT7mH eine Reduktion der Viabilität um 37% auf 63% überlebende Zellen vorlag. Um eine Information darüber zu erhalten ob durch zusätzliches exogenes SANT7mH das Überleben weiter vermindert werden kann, wurde in 2 weiteren Ansätzen zusätzlich 1µg/ml bzw. 50 µg/ml SANT7mH hinzugefügt. Analog zu Abschnitt 4.1.2 konnte durch Hinzufügen von 50µg/ml rekombinantem SANT7mH im Sinne einer angenommenen maximalen IL-6 Rezeptorblockade in Kokulturen mit HS-5-MgSLdS (39% Überlebende) und HS-5-MgSLS7mH (41% Überlebende) in nahezu identischem Ausmass Zelltod in den INA-6 Zellen induziert werden. Demgegenüber blieb 1µg/ml exogenes SANT7mH in den Kontrollansätzen erneut wirkungslos und führte in den Kokulturen mit HS-5-MgSLS7mH zu zusätzlichen 9% Zelltod in INA-6 Zellen. (Abb. 4.2.2.1). Dies deutet darauf hin, dass die wirksame SANT7mH Konzentration in den MgSLS7mH-transduzierten HS-5 Zellen deutlich über 1µg/ml und unter 50 µg/ml liegen muss. Ferner legt der Vergleich mit den Daten auf untransduzierten HS-5 (Abschnitt 4.1.2) nahe, dass die beobachtete Induktion von Zelltod ausschliesslich auf die Expression von SANT7mH und nicht auf andere unbekannte/unspezifische Toxizitäten durch den Transduktionsprozess zurückzuführen ist.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein retroviraler Gentransfer von SANT7mH in humane KMSZ technisch gut durchzuführen ist. Es war durch ein einfaches und schnelles Protokoll möglich die transduzierten Stromazellen zu selektionieren und tatsächlich auch Zelltod in darauf kultivierten Myelomzellen auszulösen ohne eine Einzelklonselektion vorzunehmen. Aufgrund der im ersten Teil der Ergebnisdarstellung erzielten Resultate schien es allerdings nicht sinnvoll diesen Ansatz weiter zu verfolgen.

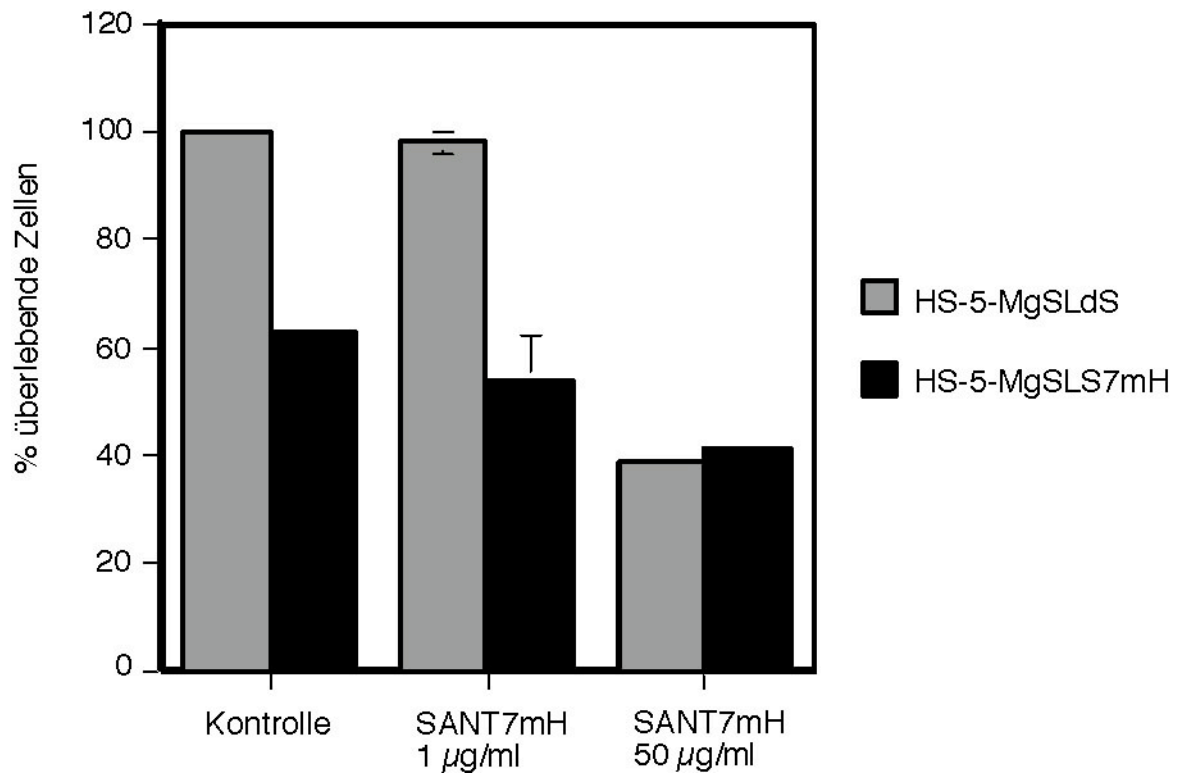


Abb. 4.2.2.1: Annexin-V/PI Assay von INA-6 Zellen nach Kokultur

1×10^5 INA-6 Zellen nach 3 Tagen Kokultur mit HS-5 Zellen (1×10^4) in Gegenwart bzw. Abwesenheit von zusätzlichem rekombinatem SANT7mH (1 bzw. $50 \mu\text{g/ml}$). Auswertung von zwei unabhängigen Experimenten. Die Y-Achse zeigt den prozentualen Anteil verbliebener lebender Zellen (Annexin-V und PI negativ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100%), die der Kokultur auf HS-5-MgSLdS ohne zusätzlichem SANT7mH entspricht.

5. Diskussion

Seit Beginn der neunziger Jahre wurde in einer sehr grossen Anzahl von Publikationen eine herausragende Bedeutung von IL-6 als Wachstums- bzw. Resistenzfaktor für Myelomzellen beschrieben [17, 44, 105, 106, 107]. Parallel dazu entwickelte sich ein besseres Verständnis der Biologie dieser Erkrankung durch neue Erkenntnisse über zytogenetische Abnormalitäten, gestörte intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen und den Einfluss des Tumormikromilieus auf die Tumorphogenese. Leider mündeten diese neu gewonnenen Erkenntnisse bis jetzt noch nicht in eine effektivere Therapie des multiplen Myeloms, sodass die diese Erkrankung weiterhin unheilbar bleibt. Einzig die Hochdosistherapie als moderneres Therapieprinzip konnte das mediane Überleben signifikant um ca. 2 Jahre verlängern, wobei auch hier keine Heilung erzielt wird [4]. Die einzige Therapiemodalität mit kurativer Zielsetzung mit in Einzelfällen dokumentiertem Langzeitüberleben ist die allogene Stammzelltransplantation, die bei Myelompatienten auch bei der Durchführung von sogenannten Mini-Protokollen mit einer exzessiven therapieassoziierten Mortalität von ca. 30% behaftet ist und nur für wenige junge Patienten unter 55 Jahren in Betracht kommt [108]. Auch hatte die Interferontherapie bei z.T. schweren Nebenwirkungen nur sehr geringen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten [109]. Das relativ neu in Erscheinung getretene Thalidomid zeigte zwar bei ca. 30% refraktärer Patienten Ansprechen, eine grosse Studie, die den Einfluss von Thalidomid auf das Gesamtüberleben untersucht, fehlt jedoch noch [10]. Aus diesen Gründen ist die Entwicklung neuer Therapieansätze, rational aus den neu gewonnenen Erkenntnissen der Pathogenese abgeleitet, dringend geboten. Hier zeichnen sich in der Hämatologie/Onkologie zwei grundlegende allgemeine Prinzipien ab: erstens die Identifikation und Blockade wachstumsstimulierender Signaltransduktionswege durch pharmakologische Inhibitoren, zweitens die Immuntherapie, z.B. in Form von Vakzinierungsstrategien oder antikörpervermittelt. Für beide Konzepte sind in der Hämatologie/Onkologie mit STI571 (Gleevec) [110, 111] und Rituximab [112, 113] bei anderen Entitäten wie z.B. der CML und Gastrointestinalen Stromatumoren bzw. Follikulären und Diffus Grosszelligen Lymphomen erfolgreiche Ansätze entwickelt worden. Während es mit Thalidomid und dessen Derivaten sowie Proteasominhibitoren erste positive Ergebnisse gibt, sind erfolgversprechende antikörpervermittelte Immuntherapien v.a. mangels geeigneter Zielantigene derzeit beim Multiplen Myelom nicht in Sicht. Immuntherapeutische Vakzinierungsstrategien konnten ebenfalls noch nicht den Nachweis klinischer Wirksamkeit erbringen[4].

Aufgrund der beschriebenen besonderen Bedeutung des Tumormikromilieus für die

Pathogenese des multiplen Myeloms zeichnet sich hier eine weitere potentielle Therapieoption ab, nämlich die gezielte Manipulation der unmittelbaren Tumorumgebung mit dem Ziel den malignen Zellen Überlebenssignale zu entziehen und sie so in die Apoptose zu treiben oder für konventionelle Therapieschemata zu sensitivieren. Dieses Konzept von „seed and soil“ also „Samen und Boden“ für die Interaktion zwischen Manifestationsort und Tumorzellen ist nicht neu, sondern wurde bereits 1889 von S. Paget entworfen [114]. Sydney Salmon entwickelte dann in den achziger Jahren dieses Jahrhunderts die Idee der Behandlung des „Bodens“, also des Knochenmarkmikromilieus, mit dem Ziel das Wachstum und Überleben von Myelomzellen zu beeinflussen [115].

Da IL-6 ein wichtiger Wachstumsfaktor in diesem Mikromilieu aus Myelomzellen und Knochenmarkstroma darstellt, sollte in der vorliegenden Arbeit der Effekt einer IL-6 Rezeptorblockade auf das Wachstum und Überleben von Myelomzellen in diesem Kontext untersucht werden. Darüberhinaus sollte ein möglichst effizienter Weg der IL-6 Rezeptorblockade getestet werden. Hierzu sollten Knochenmarksstromazellen, die in-vivo in unmittelbarer Beziehung zu Myelomzellen stehen und in in-vitro Kokulturen Therapieresistenz von Myelomzellen vermitteln können, durch retrovirale Transduktion zur Expression des IL-6 Rezeptorantagonisten SANT7 veranlasst werden. Dadurch sollte die „unterstützende“ Funktion der Stromazellen in ihr prinzipielles Gegenteil verkehrt werden.

Da für die folgenden Experimente zunächst ausreichende Mengen an rekombinantem SANT7 Protein benötigt wurden, musste zuerst ein geeignetes Aufreinigungsprotokoll etabliert werden. Hierzu wurde eine Erkennungssequenz („myc-His-Tag“) c-terminal angefügt, welche durch Bindung an eine Nickelchelatsäule eine einfache Proteinaufreinigung in grösserem Maßstab ermöglichen sollte. Das resultierende Molekül trägt den Namen SANT7mH. Die Aufreinigung konnte mit einer Ausbeute von ca. 25mg Protein aus 2 Litern Bakterienkultur mit dem gewählten Protokoll erfolgreich durchgeführt werden. Im nächsten Schritt musste dann der Nachweis der Funktion dieses veränderten Moleküls erbracht werden. Dieser Nachweis konnte an bakteriell hergestelltem SANT7mH Protein durch folgende Befunde erbracht werden: 1. SANT7mH blockiert IL-6 abhängige Proliferation der INA-6 Zelllinie in der gleichen Konzentration wie SANT7, 2. Dieser Effekt lässt sich durch einen Überschuss von IL-6 kompetieren, 3. SANT7mH greift durch Herunterregulierung der STAT3 Phosphorylierung spezifisch in den IL-6 Signalweg ein, 4. IL-6 unabhängige Zellen werden durch SANT7mH nicht in ihrer Proliferation beeinträchtigt. Diese Daten entsprechen exakt der in der Literatur beschriebenen Aktivität des SANT7 Moleküls [63, 64].

Im nächsten Schritt wurde anhand von Kokulturen mit der humanen Stromazelllinie HS-5 der supportive Charakter der KMSZ für Myelomzellen gezeigt, da in der Kokultur kein exogen zugeführtes IL-6 zum Überleben der INA-6 Zellen benötigt wurde. Durch Zugabe hoher Dosen SANT7mH konnten 64% der INA-6 Zellen in der Kokultur in die Apoptose getrieben werden bzw. eine Proliferationsinhibition von 65% erreicht werden. Allerdings liess sich bereits in diesen Experimenten die Proliferation bzw. das Überleben der INA-6 Zellen im Gegensatz zu Kulturen ohne KMSZ nicht vollständig inhibieren. Dennoch wurde in weiteren Experimenten der retrovirale Gentransfer der SANT7mH c-DNA in die HS-5 Zellen durchgeführt. Dies geschah auch unter der Vorstellung, dass, ausgehend von einer in-vivo Halbwertszeit von ca. 1,5 Minuten im Blut für IL-6, kontinuierlich in die Zellkultur sezerniertes SANT7mH möglicherweise zu einer effektiveren IL-6 Rezeptorblockade führt als exogen zugeführtes Protein [116]. Letztlich ist die tatsächliche Pharmakokinetik von SANT7mH in der Zellkultur allerdings völlig ungeklärt.

Als geeignete Methode zum Gentransfer in Stromazellen sind rekombinante Retroviren beschrieben. Seit begonnen wurde solche rekombinanten Retroviren zu Gentransferzwecken zu verwenden sind eine Vielzahl unterschiedlicher Vektortypen konstruiert worden. Allerdings existiert bis dato im Gegensatz zu hämatopoetischen Stammzellen noch kein Vektor, der speziell für starke und stabile Genexpression in KMSZ konstruiert und publiziert wurde. Aufgrund der einfachen Selektionsmethode über den dNGFR und einer bereits erfolgenden klinischen Anwendung kam deshalb in dieser Arbeit zum Gentransfer in primäre humane KMSZ der Vektor MgSL zum Einsatz [99, 100]. Die retroviralen Überstände wurden mit Hilfe der Verpackungslinie PG13 extern hergestellt (Fr. Dr. P. Dietz, MainGen GmbH, Frankfurt/Main). Die gewonnenen retroviralen Überstände waren in der Lage die humane Stromazelllinie mit einer Effizienz von 20% (MgSLdS) bzw. 40% (MgSLS7mH) zu transduzieren, was in etwa der in der Literatur für andere Vektoren beschriebenen Grössenordnung entspricht [79]. Durch zweimaliges Anreichern mit Hilfe immunomagnetischer Beads konnte der Anteil dNGFR positiver Zellen auf über 90% und die Expressionsstärke um ca. 2 Grössenordnungen erhöht werden. Die dNGFR Expression ist nach Transduktion und Selektion für mindestens 2 Monate stabil nachweisbar. RT-PCR Analysen zeigten, dass die auf diese Art generierten Zellen auch den IL-6 Rezeptorantagonisten exprimieren. Kokulturen der transduzierten Stromazellen mit der Myelomzelllinie INA-6 resultierten wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben tatsächlich durch die Expression von SANT7mH in einer deutlichen Reduktion der Viabilität der Myelomzellen. Diese Ergebnisse und ein relativ einfaches Transduktionsprotokoll weisen darauf hin, dass

KMSZ interessante Kandidaten für Gentherapieansätze sein könnten, bei denen eine kontinuierliche Produktion eines sezernierten Proteins erwünscht ist. Dementsprechend sind Ansätze zur Therapie der Hämophilie A und B mit genmodifizierten KMSZ bereits relativ fortgeschritten in der präklinischen Entwicklung [82].

Hier wäre es nun wünschenswert gewesen die Expression von SANT7mH nicht nur qualitativ auf mRNA Ebene per PCR, sondern quantitativ auf Proteinebene im Überstand der transduzierten HS-5 Zellen bestimmen zu können. Auch zu diesem Zweck wurde initial ein myc-His Epitop Cterminal an die SANT7 c-DNA angefügt. Hierzu sollte ein ELISA-System etabliert werden bei dem eine Nickelbeschichtung in der Messplatte oder ein monoklonaler anti-c-myc Antikörper als „Fänger“ dient und ein biotinyliertes polyklonales anti-IL-6 Serum als Detektionsantikörper. Mit diesem System gelang der spezifische Nachweis von rekombinantem SANT7mH Protein bis zu einer Konzentration von ca. 40 ng/ml (Daten nicht gezeigt). Aus bis jetzt ungeklärten Gründen gelang der Nachweis von SANT7mH aus dem Überstand von HS-5-MgSLS7mH Zellen jedoch nicht. Da aber wie in Abschnitt 4.2.2 dargestellt der negative Einfluss von HS-5-MgSLS7mH Zellen auf das Überleben von INA-6 Zellen nur durch SANT7mH Expression der Stromazellen erklärt werden kann und die Sensitivität des gewählten ELISA Systems deutlich über den erwarteten Konzentrationen liegt, muss ein technisches Problem zugrunde liegen. Ein Fehler in der Sequenz des transduzierten SANT7mH Konstruktes als Ursache für diese Beobachtung wurde durch Amplifikation und Sequenzierung der vollständigen SANT7mH c-DNA aus den transduzierten HS-5 Zellen ausgeschlossen. Als weitere Fehlerquellen könnte eine proteolytische Abspaltung des Nachweisepitopes an einer versteckten Proteolysestelle oder ein Vorliegen von unbekanntem Inhibitoren der Bindung von SANT7mH im Zellkulturüberstand zugrunde liegen. Eine weitere detaillierte Klärung dieser Frage wurde aufgrund fraglicher Relevanz angesichts der Ergebnisse zum unbeeinträchtigten Überleben primärer Myelomzellen in Kokultur mit primären KMSZ nach SANT7mH Behandlung nicht mehr durchgeführt.

Bei dem Versuch die im HS-5/INA-6 Zelllinienmodell gewonnenen Ergebnisse zum Wachstum und Überleben von kokultivierten Myelomzellen auf primäre Zellen (zunächst primäre untransduzierte KMSZ) zu übertragen zeigten sich Unterschiede im zellbiologischen Verhalten: im Gegensatz zur Kokultur von INA-6 mit HS-5 Zellen (64%) konnte in drei unabhängigen Experimenten in Gegenwart von primären KMSZ von 3 unterschiedlichen Spendern im Mittel nur 32% Zelltod in INA-6 Zellen durch 50 µg/ml SANT7mH ausgelöst werden. Daran schloss sich eine Analyse des Verhaltens primärer Myelomzellen auf Behandlung mit SANT7mH an.

Hier liess sich durch Zugabe von 50 µg/ml SANT7mH bei mit 2 ng/ml exogenem IL-6 kultivierten Zellen eine Reduktion der Viabilität auf 52% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erreichen. Bei kokultivierten Myelomzellen liess sich demgegenüber durch SANT7mH kein Zelltod induzieren. Dies kann prinzipiell aus zwei verschiedenen Mechanismen resultieren: 1. die eingesetzte SANT7mH Konzentration reicht nicht zu einer effektiven Blockade des IL-6 Rezeptors 2. andere Mechanismen sind in den beschriebenen Kokulturen in der Lage das Überleben von Myelomzellen nach IL-6 Rezeptorblockade zu gewährleisten. In 2 unabhängigen Kokulturen mit INA-6 Zellen wurde eine IL-6 Konzentration von 0,7 bzw. 0,9 ng/ml gemessen, SANT7mH lag also in einem ca. 25.000 fachen molaren Überschuss vor. Da SANT7mH darüber hinaus über eine ca. 70-fach höhere Affinität zum IL-6 Rezeptor als IL-6 verfügt, hätte dies eine nahezu komplette Inhibition der IL-6 Signaltransduktion und somit auch eine entsprechende Reduktion der Viabilität zumindest der INA-6 Zellen bedeuten müssen. Da dies nicht der Fall war muss man den Schluss ziehen, dass in Gegenwart von KMSZ noch andere (lösliche oder membranständige) Wachstumsfaktoren für Myelomzellen vorliegen, die das Überleben der Zellen in Abwesenheit von IL-6 ermöglichen, bzw. dessen Rolle einnehmen können. Hier ergeben sich aus der Literatur einige Kandidaten, z.B. andere Zytokine der IL-6 Familie wie z.B. LIF, Oncostatin M, IL-11 oder Cardiotrophin 1, die alle wie IL-6 selbst das gp130 Molekül als signalvermittelnden Rezeptor benutzen und somit in der Lage sein könnten ähnliche Überlebenssignale wie IL-6 zu vermitteln. Darüberhinaus sind IL-1beta, IL-10, TGF-beta, TNF-alpha, IGF oder VEGF als antiapoptotische Zytokine für Myelomzellen beschrieben [50, 117, 118, 119, 120]. Weiterhin können auch adhäsionsvermittelte Signale eine Rolle spielen, z.B. über Integrine, die an Bestandteile der Extrazellulärmatrix wie z.B. Fibronectin binden und antiapoptotische Signale vermitteln können [121, 122].

Ursprüngliches Ziel dieser Arbeit war präklinische in-vitro Daten für einen eventuellen klinischen Einsatz von SANT7 zu liefern. Um dieses Ziel weiter zu verfolgen müssten sich dementsprechend Tierversuche zur in-vivo Wirksamkeit und Pharmakokinetik von SANT7 anschliessen. Hierbei tun sich in Ermangelung eines adäquaten Tiermodells mehrere technische Probleme auf: 1. Syngene Mausmodelle sind nicht anwendbar, da SANT7 spezifisch für humane IL-6 Rezeptoren ist. 2. Eine Xenotransplantation humaner Myelomzellen in NOD-SCID Mäuse ist praktikabel [123], liefert bezüglich der Wirksamkeit von SANT7 aber ebenfalls keine sinnvollen Ergebnisse, da murines IL-6 nicht am humanen Rezeptor wirkt und keine Quelle für humanes IL-6 vorliegt. 3. Die Kreuzreaktivität von SANT7 mit anderen Spezies ausser Mensch und Maus wurde bis jetzt nicht getestet. 4. Es existiert kein spezifischer monoklonaler

Antikörper gegen SANT7, was die Erhebung pharmakokinetischer Daten deutlich erschwert. Das einzige Tiermodell welches infrage käme ist das sogenannte SCID-hu Modell, welches auf einem in SCID-Mäuse implantierten fetalen humanen Knochenfragment basiert. In dieses Knochenfragment werden dann wiederum aufgereinigte Myelomzellen aus Knochenmarkaspiraten von Myelompatienten implantiert. In 8 von 9 Fällen ist dann von der Etablierung eines humanen Myeloms im entsprechendem humanen Knochenmarksmikromilieu auszugehen[124]. Aus ethischen Gründen ist dieses Modell in Deutschland nicht zugelassen.

Angesichts der oben beschriebenen Ergebnisse schien allerdings ein weiteres Verfolgen der ursprünglichen Idee eines therapeutischen Einsatzes von SANT7 als Monotherapie nicht sinnvoll. Stattdessen drängte sich Angesichts fehlender Wirksamkeit von SANT7mH auf kokultivierte Myelomzellen zum Einen die Frage auf, ob durch Kombination von SANT7mH mit anderen Substanzen ein additiver oder sogar synergistischer Effekt im Sinne einer Resistenzminderung gegen apoptotische Stimuli erzielt werden kann, zum Anderen welche Mechanismen der durch Kokultur erworbenen Resistenz gegen IL-6 Rezeptorblockade zugrunde liegen. Die erste Frage wurde im Rahmen dieser Arbeit weiter verfolgt, die Zweite wurde hiervon abgetrennt und als eigenenes Projekt weiter bearbeitet. Sie ist weiterhin Gegenstand aktueller von der Arbeitsgruppe betriebener Forschung. Zur Klärung der Frage nach einem möglichen Sensitivierungseffekt von SANT7mH für pharmakologisch induzierte Apoptose wurden zwei Substanzen ausgewählt: 1. das Glukokorticoide Dexamethason, wichtiger Bestandteil der Standardtherapien des Multiplen Myeloms und 2. All-Trans Retinolsäure, die v.a. in experimentellen Systemen in der Lage ist Apoptose in Myelomzellen zu induzieren aber bis jetzt keinen Eingang in die klinische Anwendung beim Myelom fand. Der Wirkmechanismus beider Substanzen ist nicht vollständig geklärt, für ATRA gibt es in der Literatur Berichte über eine Hochregulation von p^{21waf} in Myelomzellen, was einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase auslöst [104, 125]. Diese Ergebnisse sind gut mit den hier vorgenommenen Zellzyklusanalysen vereinbar. Über die Wirkung von Dexamethason auf Myelomzellen gibt es Berichte über Interaktionen mit der IL-6 vermittelten Signaltransduktion. Diese und eigene Arbeiten mit der Zelllinie XG-1 (hier nicht gezeigt) zeigen, dass dexamethasonvermittelte Apoptose durch IL-6 reduziert werden kann, sodass ein additiver Effekt von SANT7mH und Dex gut erklärbar und auch von anderen Gruppen bestätigt worden ist [126, 127]. Der genaue Mechanismus glukokortikoidinduzierter Apoptose in Myelomzellen ist allerdings nicht geklärt. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von IL6 nicht nur als Wachstums- sondern v.a. auch als Resistenzfaktor für Myelomzellen. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigen weiterhin

die Vermutung, dass eine IL-6 Rezeptorblockade Myelomzellen tatsächlich empfindlicher für pharmakologisch induzierte Apoptose macht. Nicht beantwortet wurde die Frage welche Mechanismen hierfür im Einzelnen verantwortlich sind und ob dies auch für klassische zytostatische Substanzen zutrifft.

Aufgrund der seit Ende der achtziger Jahre in der Literatur beschriebenen Bedeutung von IL-6 für das Multiple Myelom wurden Phase I Studien mit murinen oder chimereisierten anti-IL-6 Antikörpern durchgeführt. Obwohl dabei in fast allen Patienten eine starke Reduktion des C-reaktiven Proteins als in-vivo Surrogatmarker für die Inhibition der IL-6 Aktivität erzielt wurde, zeigte kein Patient klinisch objektivierbares Ansprechen. Obwohl diese Resultate aufgrund kleiner Patientenzahlen als präliminär zu bewerten sind, könnten sie sich doch durch die hier dargestellten Ergebnisse teilweise erklären lassen [60, 128]. Dem Gedanken der Sensitivierung folgend wurde von der französischen Myelomstudiengruppe dann auch eine Phase II Studie zur Kombination von anti-IL-6 Antikörpern mit einer Hochdosis-Melphalan Therapie durchgeführt. Diese ergab eine Tendenz zur Erhöhung der Raten an kompletten Remissionen [129]. Gleichzeitig wird diese Strategie als risikoadaptierte Therapie für Hochrisikopatienten (Deletion Chromosom 13) weiter in französischen Studien geprüft.

Diese klinischen Studien mit dem Ziel der IL-6 Blockade beim Multiplen Myelom, sowie Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass IL-6 eine wichtige aber keine essentielle Bedeutung für das Überleben von Myelomzellen hat, die mit Knochenmarkstromazellen in unmittelbarem Kontakt stehen. Demnach wird die Blockade von IL-6 als Monotherapie voraussichtlich keine effiziente Strategie beim Multiplen Myelom darstellen. Dies steht im Gegensatz zu anderen B lymphoproliferativen Erkrankungen wie der multizentrischen Castleman Erkrankung und den transplantationsassoziierten EBV-induzierten B Zellen Lymphomen. Zur Castleman Erkrankung liegen 2 Studien vor, wovon eine mit einem murinen anti-IL-6 Antikörper durchgeführt wurde und zu einer deutlichen Reduktion der mit dieser Erkrankung einhergehenden B-Symptomatik führte [130]. Eine weitere Studie mit dem humanisierten anti-IL-6 Rezeptor Antikörper PM.1 ergab bei allen 7 eingeschlossenen Patienten ein objektivierbares Ansprechen [131]. Eine Phase I Studie mit IL-6 blockierenden Antikörpern bei 12 Patienten mit Posttransplantationslymphomen ergab bei 5 Patienten eine komplette, bei 3 Patienten eine partielle Remission. Interessant war hierbei, dass der stärkste prognostische Faktor für die Wirksamkeit dieser Therapie die Entwicklung des Lymphoms innerhalb der ersten 6 Monate nach Therapie war [132]. Möglicherweise sind in dieser Phase der Erkrankung genetische Schäden, die eine vollständige Unabhängigkeit von exogenen Überlebenssignalen begründen können ähnlich wie bei der

Castleman Erkrankung (noch) nicht vorhanden. Dies steht im Gegensatz zur Situation beim fortgeschrittenen Multiplen Myelom, wo es bereits zu genetischen Veränderungen wie z.B. Translokationen und ras Mutationen gekommen ist, die über die Aktivierung von Onkogenen eine wahrscheinliche Ursache für die beobachtete Resistenz gegenüber einer IL-6 Blockade sein können.

Dennoch könnte der oben dargestellte Sensitivierungseffekt, also eine Erniedrigung der Apoptoseresistenz der Myelomzelle durch IL-6 Blockade mit nachfolgender Therapie mit anderen Substanzen, ein interessantes Prinzip darstellen. Ob dieses so erfolgreich sein kann, dass sich dadurch der Aufwand z.B. einer Gentherapiestudie rechtfertigen lässt scheint aber fraglich. Selbst wenn sich SANT7 nicht als Medikament zur Behandlung des Multiplen Myeloms eignen sollte, ist es doch ein sehr gutes Werkzeug zur weiteren Erforschung der wirklichen Bedeutung des Zytokins IL-6 im Kontext des Tumormikromilieus bei dieser Erkrankung. Gerade auch die SANT7mH sezernierenden humanen Stromazellen scheinen geeignet durch Ausschaltung des IL-6 Signals andere Überlebenssignale für die malignen Plasmazellen zu demaskieren um deren Bedeutung und Mechanismus aufzuklären.

6. Zusammenfassung

Das Multiple Myelom ist eine klonale maligne Erkrankung der terminal differenzierten B-Zelle, d.h. der Antikörper sezernierenden Plasmazelle. Die Myelomzellen sind bis auf Ausnahmen vorwiegend im Knochenmark lokalisiert, wo sie akkumulieren, die normale Hämatopoese verdrängen und zu Knochendestruktionen führen. Man geht heute davon aus, dass die Pathogenese des Multiplen Myeloms ein Mehrstufen-Prozess ist, der ausgehend von der normalen Plasmazelle einer Abfolge genetischer (onkogener) Veränderungen entspricht, welche über das MGUS-Stadium („Monoklonale Gammopathie ungewisser Signifikanz“) zum Multiplen Myelom führen. Neben genetischen Veränderungen ist die Wechselwirkung zwischen Myelomzelle und Knochenmark-„Microenvironment“ von zentraler Bedeutung für die Pathogenese und Pathophysiologie des Plasmozytoms. So sezernieren z.B. die Zellen des Knochenmarkstroma Interleukin-6, ein Zytokin, das für Wachstum und Überleben der Plasmozytomzelle als essentiell beschrieben wurde. Die Anwendung von Substanzen, die spezifisch mit dem Interleukin-6-Signalweg interferieren könnte daher für die Entwicklung zukünftiger Therapiestrategien zur Behandlung des Multiplen Myeloms von Bedeutung sein. Eine solche Substanz ist der IL-6 Rezeptorantagonist „SANT7“ (=„Superantagonist7“), der spezifisch und kompetitiv den IL-6 Rezeptor blockiert. Hierbei hat SANT7 im Vergleich zu IL-6 eine ca. 70-fach höhere Affinität zum IL-6 Rezeptor. Allerdings ist aufgrund der hohen lokalen IL-6 Konzentration im Knochenmark von Myelompatienten nicht zu erwarten, dass die systemische Gabe von SANT7 zu einer ausreichenden Antagonisierung führt. Um die biologisch wirksame Konzentration dieses Antagonisten bei einer möglichen klinischen Anwendung weiter zu verbessern, wäre es wünschenswert eine lokal hohe Konzentration im Knochenmark zu erzielen. Da Knochenmarkstromazellen nach systemischer Gabe bevorzugt im Knochenmark „homen“, wäre die Expression des IL-6 Antagonisten in autologen Knochenmarkstromazellen ein aussichtsreicher gentherapeutischer Ansatz. Ziel dieses Projektes war es daher, den oben beschriebenen IL-6 Rezeptorantagonisten in humanen Knochenmarkstromazellen stabil zur Expression zu bringen und die biologische Wirksamkeit dieser auf diese Art und Weise genmodifizierten Zellen zu testen. Zuvor sollten Daten über das Wachstum und Überleben von Myelomzellen in Kokultur mit Knochenmarkstromazellen in Gegenwart und Abwesenheit von SANT7 gewonnen werden.

Es wurde zunächst für die anstehenden Versuche ein c-terminal „markiertes“ SANT7 Konstrukt (SANT7mH) bakteriell hergestellt. Die Integrität des Moleküls wurde biochemisch, die Funktionalität anhand von Proliferationsassays mit der IL-6 abhängigen humanen

Myelomzelllinie INA-6 demonstriert. Es gelang ein Aufreinigungsprotokoll zu entwickeln, welches in der Lage ist rekombinantes SANT7mH Protein in genügend grosser Menge und Reinheit zu liefern. Gleichzeitig wurde ein retrovirales System beruhend auf dem Vektor MgSLdS zur Transduktion humaner Knochenmarkstromazellen etabliert. Dieser Vektor trägt die Information eines intrazellulär trunkierten „Nerve Growth Factor Receptor“ (dNGFR) als Selektionsmarker. Mit Hilfe auswärts generierter retroviraler Überstände konnte die humane Stromazelllinie HS-5 problemlos transduziert werden. Nach zweimaliger immunomagnetischer Selektion über den dNGFR konnte eine Transgenexpression in nahezu 100% der Zellen nachgewiesen werden. Der Expressionsnachweis des SANT7mH konnte per RT-PCR erbracht werden.

Bereits in orientierenden Kokulturrexperimenten der IL-6 abhängigen Myelomzelllinie INA-6 mit untransduzierten HS-5 Zellen zeichnete sich ab, dass die Empfindlichkeit der Myelomzellen auf IL-6 Rezeptorblockade durch SANT7mH durch diese Kokultur stark verändert wurde. So konnte in der Kokultur auch mit hohen SANT7mH Dosierungen von 50µg/ml keine vollständige Proliferationsinhibition bzw. Apoptoseinduktion beobachtet werden (35% überlebende Zellen nach 3 Tagen). Diese Ergebnisse liessen sich mit den transduzierten (also SANT7mH produzierenden) HS-5 Zellen bestätigen. Hier zeigte sich zwar ein deutlicher Einfluss der SANT7mH Expression der HS-5-MgSLS7mH Zellen, da im Vergleich zur HS-5-MgSLdS Kontrolle bereits ohne zusätzliches exogenes SANT7mH eine Reduktion der Viabilität um 37% vorlag, jedoch zwei drittel der INA-6 Zellen nach Beendigung der Kultur noch am Leben waren. Im weiteren Verlauf wurden diese Kokulturrexperimente mit primären humanen Knochenmarkstromazellen aus Knochenmarkaspiraten unterschiedlicher Spender mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert. Im Gegensatz zur HS-5 Zelllinie war die durch primäre KMSZ ausgelöste Resistenz der INA-6 Zellen gegenüber IL-6 Rezeptorblockade durch SANT7mH noch ausgeprägter. Hier zeigte sich durch 50µg/ml SANT7mH nur noch eine Zelltodrate von 32%. Um zu einer grundlegenden Aussage über die prinzipielle Wirksamkeit einer IL-6 Blockade von kokultivierten Myelomzellen zu kommen wurden im nächsten Schritt primäre humane Myelomzellen aus diagnostischen Knochenmarkpunktionen immunomagnetisch isoliert und in die Kokultur mit primären KMSZ eingesetzt. Hier zeigte sich nun im Apoptoseassay eine vollständige Resistenz der Myelomzellen gegenüber IL-6 Blockade durch SANT7mH. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden weitere Gentransferexperimente z.B. in primäre humane KMSZ nicht durchgeführt. Stattdessen wurden weitere Untersuchungen zur Biologie der kokultivierten Myelomzellen durchgeführt. Es wurde getestet ob SANT7mH in der Lage ist die

Medikamentenresistenz von Myelomzellen zu beeinflussen. Hierzu wurden zwei Substanzen ausgewählt: 1. das Glucocorticoid Dexamethason, wichtiger Bestandteil der Standardtherapien des Myeloms, 2. All-Trans Retinolsäure, die v.a. in experimentellen Systemen in der Lage ist Apoptose in Myelomzellen zu induzieren aber bis jetzt keinen Eingang in die klinische Anwendung beim Myelom fand. Zusammenfassend zeigt sich, dass die Kombination aus Dex, ATRA und SANT7mH in der Lage ist die Proliferation der INA-6 Zellen in Gegenwart von KMSZ deutlich zu inhibieren. Dieser Effekt ist das Resultat sowohl von einer Apoptoseinduktion als auch eines Zellzyklusstopps. Im nächsten Schritt wurde erneut überprüft, ob sich diese Ergebnisse auf primäre Myelomzellen übertragen lassen. Es wurden Myelomzellen von 3 Spendern mit allen drei Substanzen und den sich daraus ergebenden Kombinationen per Viabilitätsassay analysiert. Es zeigte sich, dass bei primären Zellen in Gegenwart von KMSZ nur die Kombination aus Dex, ATRA und SANT7 in der Lage war signifikant Zelltod zu induzieren. Letztlich bilden somit drei Resultate den Kern dieser Arbeit:

1. durch Kokultivierung mit Knochenmarkstromazellen werden Myelomzellen unabhängig von Il-6 für Wachstum und Überleben
2. Durch Blockade des IL-6 Rezeptors kokultivierter Myelomzellen erhöht sich deren Empfindlichkeit für pharmakologisch induzierte Apoptose
3. Knochenmarkstromazellen lassen sich gut retroviral transduzieren und sind deshalb ein interessantes Ziel für Gentherapieansätze.

Zusammenfassend lässt sich deshalb feststellen, dass es gelungen ist im Sinne des ursprünglichen Projektes ein retrovirales Gentransfersystem zur Transduktion humaner Knochenmarkstromazellen mit einem SANT7mH Konstrukt zu etablieren. Gleichzeitig zeigte sich aber in den entsprechenden Kokultorexperimenten eine stark veränderte Biologie der Myelomzellen im Sinne einer Resistenz gegenüber durch IL-6 Blockade induzierter Apoptose, sodass weiterführende Experimente mit diesem retroviralen System nicht durchgeführt wurden. Gleichzeitig sind die beobachteten zellbiologischen Phänomene Gegenstand intensiver weiterer Forschung, da sie grundlegende Fragen zur Bedeutung von IL-6 als Wachstumsfaktor für Myelomzellen aufwerfen. Die erhobenen Daten legen nahe, dass die in der Literatur z.T. undifferenziert beschriebene Bedeutung von IL-6 als „essentieller“ Wachstumsfaktor für Myelomzellen nicht aufrechterhalten werden kann.

7.Literatur

- [1] Bataille, R. und Harousseau, J. L. (1997): Multiple myeloma, N Engl J Med (Band 336), Nr. 23, Seite 1657-64.
- [2] Berenson, J. R. (2002): Advances in the biology and treatment of myeloma bone disease, Semin Oncol (Band 29), Nr. 6 Suppl 17, Seite 11-6.
- [3] Hahn, T.; Wingard, J. R., et al. (2003): The role of cytotoxic therapy with hematopoietic stem cell transplantation in the therapy of multiple myeloma: an evidence-based review, Biol Blood Marrow Transplant (Band 9), Nr. 1, Seite 4-37.
- [4] Barlogie, B.; Shaughnessy, J. D., et al. (2003): Treatment of multiple myeloma, Blood.
- [5] Child, J. A.; Morgan, G. J., et al. (2003): High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma, N Engl J Med (Band 348), Nr. 19, Seite 1875-83.
- [6] Attal, M.; Harousseau, J. L., et al. (1996): A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome, N Engl J Med (Band 335), Nr. 2, Seite 91-7.
- [7] Lee, C. K.; Badros, A., et al. (2003): Prognostic factors in allogeneic transplantation for patients with high-risk multiple myeloma after reduced intensity conditioning, Exp Hematol (Band 31), Nr. 1, Seite 73-80.
- [8] Kroger, N.; Schwerdtfeger, R., et al. (2002): Autologous stem cell transplantation followed by a dose-reduced allograft induces high complete remission rate in multiple myeloma, Blood (Band 100), Nr. 3, Seite 755-60.
- [9] Berenson, J. R.; Lichtenstein, A., et al. (1996): Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma. Myeloma Aredia Study Group, N Engl J Med (Band 334), Nr. 8, Seite 488-93.
- [10] Singhal, S.; Mehta, J., et al. (1999): Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma, N Engl J Med (Band 341), Nr. 21, Seite 1565-71.
- [11] Richardson, P. G.; Schlossman, R. L., et al. (2002): Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma, Blood (Band 100), Nr. 9, Seite 3063-7.
- [12] Munshi, N. C.; Tricot, G., et al. (2002): Clinical activity of arsenic trioxide for the treatment of multiple myeloma, Leukemia (Band 16), Nr. 9, Seite 1835-7.
- [13] Richardson, P. G.; Barlogie, B., et al. (2003): A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma, N Engl J Med (Band 348), Nr. 26, Seite 2609-17.
- [14] Ahmed, R. und Gray, D. (1996): Immunological memory and protective immunity: understanding their relation, Science (Band 272), Nr. 5258, Seite 54-60.

- [15] Liu, Y. J. und Banchereau, J. (1997): Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells, *Semin Immunol* (Band 9), Nr. 4, Seite 235-40.
- [16] Vescio, R. A.; Cao, J., et al. (1995): Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intracloal diversity, *J Immunol* (Band 155), Nr. 5, Seite 2487-97.
- [17] Hallek, M.; Leif Bergsagel, P., et al. (1998): Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process, *Blood* (Band 91), Nr. 1, Seite 3-21.
- [18] Latreille, J.; Barlogie, B., et al. (1980): Cellular DNA content as a marker of human multiple myeloma, *Blood* (Band 55), Nr. 3, Seite 403-8.
- [19] Dewald, G. W.; Kyle, R. A., et al. (1985): The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis, *Blood* (Band 66), Nr. 2, Seite 380-90.
- [20] Bergsagel, P. L. und Kuehl, W. M. (2001): Chromosome translocations in multiple myeloma, *Oncogene* (Band 20), Nr. 40, Seite 5611-22.
- [21] Massaia, M.; Borrione, P., et al. (1999): Idiotype vaccination in human myeloma: generation of tumor-specific immune responses after high-dose chemotherapy, *Blood* (Band 94), Nr. 2, Seite 673-83.
- [22] Reichardt, V. L.; Okada, C. Y., et al. (1999): Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma--a feasibility study, *Blood* (Band 93), Nr. 7, Seite 2411-9.
- [23] Kyle, R. A.; Therneau, T. M., et al. (2002): A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance, *N Engl J Med* (Band 346), Nr. 8, Seite 564-9.
- [24] Salmon, S.E. und Seligmann, M. (1974): B-cell neoplasia in men, *Lancet* (Band 2), Seite 1230-1233.
- [25] Drach, J.; Angerler, J., et al. (1995): Interphase fluorescence in situ hybridization identifies chromosomal abnormalities in plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, *Blood* (Band 86), Nr. 10, Seite 3915-21.
- [26] Zandecki, M.; Obein, V., et al. (1995): Monoclonal gammopathy of undetermined significance: chromosome changes are a common finding within bone marrow plasma cells, *Br J Haematol* (Band 90), Nr. 3, Seite 693-6.
- [27] Avet-Loiseau, H.; Li, J. Y., et al. (1999): Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome, *Blood* (Band 94), Nr. 8, Seite 2583-9.
- [28] Zhan, F.; Hardin, J., et al. (2002): Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells, *Blood* (Band 99), Nr. 5, Seite 1745-57.
- [29] Avet-Loiseau, H.; Gerson, F., et al. (2001): Rearrangements of the c-myc oncogene are present

in 15% of primary human multiple myeloma tumors, *Blood* (Band 98), Nr. 10, Seite 3082-6.

[30] Bergsagel, P. L.; Chesi, M., et al. (1996): Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 24, Seite 13931-6.

[31] Chesi, M.; Bergsagel, P. L., et al. (1996): Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines, *Blood* (Band 88), Nr. 2, Seite 674-81.

[32] Motokura, T. und Arnold, A. (1993): Cyclins and oncogenesis, *Biochim Biophys Acta* (Band 1155), Nr. 1, Seite 63-78.

[33] Chesi, M.; Brents, L. A., et al. (2001): Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma, *Blood* (Band 97), Nr. 3, Seite 729-36.

[34] Plowright, E. E.; Li, Z., et al. (2000): Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis, *Blood* (Band 95), Nr. 3, Seite 992-8.

[35] Greil, R.; Fasching, B., et al. (1991): Expression of the c-myc proto-oncogene in multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia: an in situ analysis, *Blood* (Band 78), Nr. 1, Seite 180-91.

[36] Paulin, F. E.; West, M. J., et al. (1996): Aberrant translational control of the c-myc gene in multiple myeloma, *Oncogene* (Band 13), Nr. 3, Seite 505-13.

[37] Zojer, N.; Konigsberg, R., et al. (2000): Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization, *Blood* (Band 95), Nr. 6, Seite 1925-30.

[38] Corradini, P.; Ladetto, M., et al. (1993): Mutational activation of N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias, *Blood* (Band 81), Nr. 10, Seite 2708-13.

[39] Neri, A.; Murphy, J. P., et al. (1989): Ras oncogene mutation in multiple myeloma, *J Exp Med* (Band 170), Nr. 5, Seite 1715-25.

[40] Portier, M.; Moles, J. P., et al. (1992): p53 and RAS gene mutations in multiple myeloma, *Oncogene* (Band 7), Nr. 12, Seite 2539-43.

[41] Zhang, X. G.; Klein, B., et al. (1989): Interleukin-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma, *Blood* (Band 74), Nr. 1, Seite 11-3.

[42] Tanabe, O.; Kawano, M., et al. (1989): BSF-2/IL-6 does not augment Ig secretion but stimulates proliferation in myeloma cells, *Am J Hematol* (Band 31), Nr. 4, Seite 258-62.

[43] Kopf, M.; Baumann, H., et al. (1994): Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice, *Nature* (Band 368), Nr. 6469, Seite 339-42.

[44] Hilbert, D. M.; Kopf, M., et al. (1995): Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms, *J Exp Med* (Band 182), Nr. 1, Seite 243-8.

[45] Suematsu, S.; Matsusaka, T., et al. (1992): Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 89), Nr. 1, Seite 232-5.

[46] Zhang, X. G.; Gaillard, J. P., et al. (1994): Reproducible obtaining of human myeloma cell

lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma, *Blood* (Band 83), Nr. 12, Seite 3654-63.

[47] Suzuki, H.; Yasukawa, K., et al. (1992): Anti-human interleukin-6 receptor antibody inhibits human myeloma growth in vivo, *Eur J Immunol* (Band 22), Nr. 8, Seite 1989-93.

[48] Chauhan, D.; Uchiyama, H., et al. (1996): Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B, *Blood* (Band 87), Nr. 3, Seite 1104-12.

[49] Uchiyama, H.; Barut, B. A., et al. (1993): Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion, *Blood* (Band 82), Nr. 12, Seite 3712-20.

[50] Dankbar, B.; Padro, T., et al. (2000): Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma, *Blood* (Band 95), Nr. 8, Seite 2630-2336.

[51] Jernberg, Wiklund H.; Pettersson, M., et al. (1992): Increase in interleukin 6 (IL-6) and IL-6 receptor expression in a human multiple myeloma cell line, U-266, during long-term in vitro culture and the development of a possible autocrine IL-6 loop, *Leukemia* (Band 6), Nr. 4, Seite 310-8.

[52] Kishimoto, T.; Akira, S., et al. (1995): Interleukin-6 family of cytokines and gp130, *Blood* (Band 86), Nr. 4, Seite 1243-54.

[53] Murakami, M.; Hibi, M., et al. (1993): IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase, *Science* (Band 260), Nr. 5115, Seite 1808-10.

[54] Catlett Falcone, R.; Landowski, T. H., et al. (1999): Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells, *Immunity* (Band 10), Nr. 1, Seite 105-15.

[55] Heinrich, P. C.; Behrmann, I., et al. (1998): Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway, *Biochem J* (Band 334), Nr. Pt 2, Seite 297-314.

[56] Ogata, A.; Chauhan, D., et al. (1997): IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade, *J Immunol* (Band 159), Nr. 5, Seite 2212-21.

[57] Billadeau, D.; Liu, P., et al. (1997): Activating mutations in the N- and K-ras oncogenes differentially affect the growth properties of the IL-6-dependent myeloma cell line ANBL6, *Cancer Res* (Band 57), Nr. 11, Seite 2268-75.

[58] Hsu, Jh; Shi, Y., et al. (2001): The AKT kinase is activated in multiple myeloma tumor cells, *Blood* (Band 98), Nr. 9, Seite 2853-5.

[59] Hideshima, T.; Nakamura, N., et al. (2001): Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma, *Oncogene* (Band 20), Nr. 42, Seite 5991-6000.

[60] Bataille, R.; Barlogie, B., et al. (1995): Biologic effects of anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma, *Blood* (Band 86), Nr. 2, Seite 685-91.

[61] Montero Julian, F. A.; Klein, B., et al. (1995): Pharmacokinetic study of anti-interleukin-6 (IL-6) therapy with monoclonal antibodies: enhancement of IL-6 clearance by cocktails of anti-IL-6 antibodies, *Blood* (Band 85), Nr. 4, Seite 917-24.

[62] Lu, Z. Y.; Brailly, H., et al. (1995): Measurement of whole body interleukin-6 (IL-6) production: prediction of the efficacy of anti-IL-6 treatments, *Blood* (Band 86), Nr. 8, Seite 3123-31.

[63] Sporeno, E.; Savino, R., et al. (1996): Human interleukin-6 receptor super-antagonists with high potency and wide spectrum on multiple myeloma cells, *Blood* (Band 87), Nr. 11, Seite 4510-9.

[64] Demartis, A.; Bernassola, F., et al. (1996): Interleukin 6 receptor superantagonists are potent inducers of human multiple myeloma cell death, *Cancer Res* (Band 56), Nr. 18, Seite 4213-8.

[65] Renne, C.; Kallen, K. J., et al. (1998): A new type of cytokine receptor antagonist directly targeting gp130, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 42, Seite 27213-9.

[66] Tamanoi, F. (1993): Inhibitors of Ras farnesyltransferases, *Trends Biochem Sci* (Band 18), Nr. 9, Seite 349-53.

[67] De Vos, J.; Jourdan, M., et al. (2000): JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells, *Br J Haematol* (Band 109), Nr. 4, Seite 823-8.

[68] Friedenstein, A. J.; Piatetzky, Shapiro, II, et al. (1966): Osteogenesis in transplants of bone marrow cells, *J Embryol Exp Morphol* (Band 16), Nr. 3, Seite 381-90.

[69] Friedenstein, A. J.; Gorskaja, J. F., et al. (1976): Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs, *Exp Hematol* (Band 4), Nr. 5, Seite 267-74.

[70] Bruder, S. P.; Jaiswal, N., et al. (1997): Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation, *J Cell Biochem* (Band 64), Nr. 2, Seite 278-94.

[71] Anklesaria, P.; Kase, K., et al. (1987): Engraftment of a clonal bone marrow stromal cell line in vivo stimulates hematopoietic recovery from total body irradiation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 84), Nr. 21, Seite 7681-5.

[72] Prockop, D. J. (1997): Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues, *Science* (Band 276), Nr. 5309, Seite 71-4.

[73] Conget, P. A. und Minguell, J. J. (1999): Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells, *J Cell Physiol* (Band 181), Nr. 1, Seite 67-73.

[74] Krebsbach, P. H.; Kuznetsov, S. A., et al. (1999): Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application, *Crit Rev Oral Biol Med* (Band 10), Nr. 2, Seite 165-81.

[75] Bianco, P. und Gehron Robey, P. (2000): Marrow stromal stem cells, *J Clin Invest* (Band 105), Nr. 12, Seite 1663-8.

[76] Pereira, R. F.; Halford, K. W., et al. (1995): Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 92), Nr. 11, Seite 4857-61.

[77] Huss, R.; Smith, F. O., et al. (1995): Homing and immunogenicity of murine stromal

cells transfected with xenogeneic MHC class II genes, *Cell Transplant* (Band 4), Nr. 5, Seite 483-91.

[78] Goan, S. R.; Junghahn, I., et al. (2000): Donor stromal cells from human blood engraft in NOD/SCID mice, *Blood* (Band 96), Nr. 12, Seite 3971-8.

[79] Marx, J. C.; Allay, J. A., et al. (1999): High-efficiency transduction and long-term gene expression with a murine stem cell retroviral vector encoding the green fluorescent protein in human marrow stromal cells, *Hum Gene Ther* (Band 10), Nr. 7, Seite 1163-73.

[80] Cherington, V.; Chiang, G. G., et al. (1998): Retroviral vector-modified bone marrow stromal cells secrete biologically active factor IX in vitro and transiently deliver therapeutic levels of human factor IX to the plasma of dogs after reinfusion, *Hum Gene Ther* (Band 9), Nr. 10, Seite 1397-407.

[81] Chiang, G. G.; Rubin, H. L., et al. (1999): Bone marrow stromal cell-mediated gene therapy for hemophilia A: in vitro expression of human factor VIII with high biological activity requires the inclusion of the proteolytic site at amino acid 1648, *Hum Gene Ther* (Band 10), Nr. 1, Seite 61-76.

[82] Van Damme, A.; Chuah, M. K., et al. (2003): Bone marrow mesenchymal cells for haemophilia A gene therapy using retroviral vectors with modified long-terminal repeats, *Haemophilia* (Band 9), Nr. 1, Seite 94-103.

[83] Lazarus, H. M.; Haynesworth, S. E., et al. (1995): Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use, *Bone Marrow Transplant* (Band 16), Nr. 4, Seite 557-64.

[84] Chang, L. J. und Gay, E. E. (2001): The molecular genetics of lentiviral vectors--current and future perspectives, *Curr Gene Ther* (Band 1), Nr. 3, Seite 237-51.

[85] Woods, N. B.; Ooka, A., et al. (2002): Development of gene therapy for hematopoietic stem cells using lentiviral vectors, *Leukemia* (Band 16), Nr. 4, Seite 563-9.

[86] Vassilopoulos, G.; Trobridge, G., et al. (2001): Gene transfer into murine hematopoietic stem cells with helper-free foamy virus vectors, *Blood* (Band 98), Nr. 3, Seite 604-9.

[87] Darnell, James; Lodish, Harvey, et al. (1993): *Molekulare Zellbiologie*, Berlin.

[88] Donahue, R. E.; Kessler, S. W., et al. (1992): Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer, *J Exp Med* (Band 176), Nr. 4, Seite 1125-35.

[89] Mann, R.; Mulligan, R. C., et al. (1983): Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus, *Cell* (Band 33), Nr. 1, Seite 153-9.

[90] Martinez, I. und Dornburg, R. (1996): Partial reconstitution of a replication-competent retrovirus in helper cells with partial overlaps between vector and helper cell genomes, *Hum Gene Ther* (Band 7), Nr. 6, Seite 705-12.

[91] Markowitz, D.; Goff, S., et al. (1988): A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids, *J Virol* (Band 62), Nr. 4, Seite 1120-4.

[92] Markowitz, D.; Hesdorffer, C., et al. (1990): Retroviral gene transfer using safe and efficient packaging cell lines, *Ann N Y Acad Sci* (Band 612), Nr. 407, Seite 407-14.

[93] Marshall, E. (2003): Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia, *Science* (Band 299), Nr. 5605, Seite 320.

[94] Hacein-Bey-Abina, S.; von Kalle, C., et al. (2003): A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency, *N Engl J Med* (Band 348), Nr. 3, Seite 255-6.

[95] Savino, R.; Ciapponi, L., et al. (1994): Rational design of a receptor super-antagonist of human interleukin-6, *Embo J* (Band 13), Nr. 24, Seite 5863-70.

[96] Arcone, R.; Pucci, P., et al. (1991): Single-step purification and structural characterization of human interleukin-6 produced in *Escherichia coli* from a T7 RNA polymerase expression vector, *Eur J Biochem* (Band 198), Nr. 3, Seite 541-7.

[97] Burger, R.; Guenther, A., et al. (2001): Gp130 and ras mediated signaling in human plasma cell line INA-6: a cytokine-regulated tumor model for plasmacytoma, *The Hematology Journal* (Band 2), Nr. 1, Seite 42-53.

[98] Roecklein, B. A. und Torok-Storb, B. (1995): Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes, *Blood* (Band 85), Nr. 4, Seite 997-1005.

[99] Becker, S.; Wasser, S., et al. (1998): Correction of respiratory burst activity in X-linked chronic granulomatous cells to therapeutically relevant levels after gene transfer into bone marrow CD34+ cells, *Hum Gene Ther* (Band 9), Nr. 11, Seite 1561-70.

[100] Grez, M.; Becker, S., et al. (2000): Gene therapy of chronic granulomatous disease, *Bone Marrow Transplant* (Band 25), Nr. Suppl 2, Seite S99-104.

[101] Honemann, D.; Chatterjee, M., et al. (2001): The IL-6 receptor antagonist SANT-7 overcomes bone marrow stromal cell-mediated drug resistance of multiple myeloma cells, *Int J Cancer* (Band 93), Nr. 5, Seite 674-80.

[102] Chatterjee, M.; Honemann, D., et al. (2002): In the presence of bone marrow stromal cells human multiple myeloma cells become independent of the IL-6/gp130/STAT3 pathway, *Blood* (Band 100), Nr. 9, Seite 3311-8.

[103] Ogata, A.; Nishimoto, N., et al. (1994): Inhibitory effect of all-trans retinoic acid on the growth of freshly isolated myeloma cells via interference with interleukin-6 signal transduction [see comments], *Blood* (Band 84), Nr. 9, Seite 3040-6.

[104] Chen, Y. H.; Lavelle, D., et al. (1999): Growth inhibition of a human myeloma cell line by all-trans retinoic acid is not mediated through downregulation of interleukin-6 receptors but through upregulation of p21(WAF1), *Blood* (Band 94), Nr. 1, Seite 251-9.

[105] Barker, H. F.; Ball, J., et al. (1993): Multiple myeloma: the biology of malignant plasma cells, *Blood Rev* (Band 7), Nr. 1, Seite 19-23.

[106] Barut, B. A.; Zon, L. I., et al. (1992): Role of interleukin 6 in the growth of myeloma-derived cell lines, *Leuk Res* (Band 16), Nr. 10, Seite 951-9.

- [107] Hirano, T.; Suematsu, S., et al. (1992): The role of interleukin 6 in plasmacytomagenesis, *Ciba Found Symp* (Band 167), Nr. 188, Seite 188-96.
- [108] Bensinger, W. I. (2003): Recent developments in hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma, *Int J Hematol* (Band 77), Nr. 3, Seite 232-8.
- [109] Fritz, E. und Ludwig, H. (2000): Interferon-alpha treatment in multiple myeloma: meta-analysis of 30 randomised trials among 3948 patients, *Ann Oncol* (Band 11), Nr. 11, Seite 1427-36.
- [110] Kurzrock, R.; Kantarjian, H. M., et al. (2003): Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics, *Ann Intern Med* (Band 138), Nr. 10, Seite 819-30.
- [111] Verweij, J.; van Oosterom, A., et al. (2003): Imatinib mesylate (STI-571 Glivec(R), Gleevec) is an active agent for gastrointestinal stromal tumours, but does not yield responses in other soft-tissue sarcomas that are unselected for a molecular target. Results from an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group phase II study, *Eur J Cancer* (Band 39), Nr. 14, Seite 2006-11.
- [112] Czuczman, M. S. (1999): CHOP plus rituximab chemoimmunotherapy of indolent B-cell lymphoma, *Semin Oncol* (Band 26), Nr. 5 Suppl 14, Seite 88-96.
- [113] Coiffier, B.; Lepage, E., et al. (2002): CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma, *N Engl J Med* (Band 346), Nr. 4, Seite 235-42.
- [114] Paget, S. (1889): The distribution of secondary growths in cancer of the breast, *The Lancet*, Seite 571-73.
- [115] Durie, B. G. und Salmon, S. E. (1982): The current status and future prospects of treatment for multiple myeloma, *Clin Haematol* (Band 11), Nr. 1, Seite 181-210.
- [116] Sonne, O.; Davidsen, O., et al. (1990): Cellular targets and receptors for interleukin-6. I. In vivo and in vitro uptake of IL-6 in liver and hepatocytes, *Eur J Clin Invest* (Band 20), Nr. 4, Seite 366-76.
- [117] Thomas, X.; Anglaret, B., et al. (1998): Interdependence between cytokines and cell adhesion molecules to induce interleukin-6 production by stromal cells in myeloma, *Leuk Lymphoma* (Band 32), Nr. 1-2, Seite 107-19.
- [118] Zhang, X. G.; Gu, J. J., et al. (1994): Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130, *J Exp Med* (Band 179), Nr. 4, Seite 1337-42.
- [119] Nishimoto, N.; Ogata, A., et al. (1994): Oncostatin M, leukemia inhibitory factor, and interleukin 6 induce the proliferation of human plasmacytoma cells via the common signal transducer, gp130, *J Exp Med* (Band 179), Nr. 4, Seite 1343-7.
- [120] GE, NL. und Rudikoff, S. (2000): Insulin-like growth factor I is adual effector of multiple myeloma cell growth, *Blood* (Band 96), Nr. 8, Seite 2856-2861.

- [121] Damiano, J. S.; Cress, A. E., et al. (1999): Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines, *Blood* (Band 93), Nr. 5, Seite 1658-67.
- [122] Sanz-Rodriguez, F. und Teixido, J. (2001): VLA-4-dependent myeloma cell adhesion, *Leuk Lymphoma* (Band 41), Nr. 3-4, Seite 239-45.
- [123] Pilarski, L. M.; Hipperson, G., et al. (2000): Myeloma progenitors in the blood of patients with aggressive or minimal disease: engraftment and self-renewal of primary human myeloma in the bone marrow of NOD SCID mice, *Blood* (Band 95), Nr. 3, Seite 1056-65.
- [124] Yaccoby, S. und Epstein, J. (1999): The proliferative potential of myeloma plasma cells manifest in the SCID-hu host, *Blood* (Band 94), Nr. 10, Seite 3576-82.
- [125] Chen, Y. H.; Desai, P., et al. (1996): Inhibition of myeloma cell growth by dexamethasone and all-trans retinoic acid: synergy through modulation of interleukin-6 autocrine loop at multiple sites, *Blood* (Band 87), Nr. 1, Seite 314-23.
- [126] Tassone, P.; Forciniti, S., et al. (2000): Synergistic induction of growth arrest and apoptosis of human myeloma cells by the IL-6 super-antagonist Sant7 and Dexamethasone, *Cell Death Differ* (Band 7), Nr. 3, Seite 327-8.
- [127] Chauhan, D.; Pandey, P., et al. (2000): SHP2 Mediates the Protective Effect of Interleukin-6 Against Dexamethasone-Induced Apoptosis in Multiple Myeloma Cells, *Journal of Biological Chemistry* (Band 275), Seite 27845-27850.
- [128] van Zaanen, H. C.; Lokhorst, H. M., et al. (1998): Chimaeric anti-interleukin 6 monoclonal antibodies in the treatment of advanced multiple myeloma: a phase I dose-escalating study, *Br J Haematol* (Band 102), Nr. 3, Seite 783-90.
- [129] Moreau, P.; Harousseau, J. L., et al. (2000): A combination of anti-interleukin 6 murine monoclonal antibody with dexamethasone and high-dose melphalan induces high complete response rates in advanced multiple myeloma, *Br J Haematol* (Band 109), Nr. 3, Seite 661-4.
- [130] Beck, J. T.; Hsu, S. M., et al. (1994): Brief report: alleviation of systemic manifestations of Castleman's disease by monoclonal anti-interleukin-6 antibody, *N Engl J Med* (Band 330), Nr. 9, Seite 602-5.
- [131] Nishimoto, N.; Sasai, M., et al. (2000): Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy, *Blood* (Band 95), Nr. 1, Seite 56-61.
- [132] Haddad, E.; Paczesny, S., et al. (2001): Treatment of B-lymphoproliferative disorder with a monoclonal anti-interleukin-6 antibody in 12 patients: a multicenter phase 1-2 clinical trial, *Blood* (Band 97), Nr. 6, Seite 1590-7.

Anhang A: Publikationen

Die vorliegende Arbeit war Grundlage für folgende Publikationen:

Honemann, D.; Chatterjee, M., et al. (2001): The IL-6 receptor antagonist SANT-7 overcomes bone marrow stromal cell-mediated drug resistance of multiple myeloma cells, *Int J Cancer* (Band 93), Nr. 5, Seite 674-80.

Chatterjee, M.*; Honemann, D.*, et al. (2002): In the presence of bone marrow stromal cells human multiple myeloma cells become independent of the IL-6/gp130/STAT3 pathway, *Blood* (Band 100), Nr. 9, Seite 3311-8

*gleichberechtigte Erstautoren

Anhang B: Verwendete Substanzen und Bezugsquellen:

- Agarose: Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf, Deutschland
- Alamar Blue: Biosource, Solingen, Deutschland
- ATRA: Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- Annexin V-FITC: Bender MedSystems, Wien, Österreich
- Anti-6xHis: Dianova, Hamburg, Deutschland
- Anti-CD138 Beads: Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
- Anti-dNGFR: Biosource, Solingen, Deutschland
- Anti-IL-6 ELISA: R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
- Anti-Maus IgG Beads: Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
- Anti-Maus IgG FITC F(ab)₂: Dianova, Hamburg, Deutschland
- Anti-STAT3: Biosource, Solingen, Deutschland
- Beta-Mercaptoethanol: Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Dex: Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- DMEM: Biochrom, Berlin, Deutschland
- ECL: Amersham, Braunschweig, Deutschland
- FCS: Biochrom, Berlin, Deutschland
- Glutathion: Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- Glycerol: Roth, Karlsruhe, Deutschland
- GndHCL: Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- IL-6: PromoCell, Heidelberg, Deutschland
- Imidazol: Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- IPTG: Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- MACS: Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
- NaH₂PO₄: Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Na-Pyruvat: Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
- Nickel-Agarose: Qiagen, Hilden, Deutschland
- Oligonukleotide: InVitek, Berlin, Deutschland
- "Oligotex" m-RNA Kit: Qiagen, Hilden, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin: Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

- pET 15b: Novagen, Bad Soden, Deutschland
- pGem-T: Promega, Mannheim, Deutschland
- PI: Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- Polyacrylamid: Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Polybrene: Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- DNA-modifizierende Enzyme: MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
- RPMI: Biochrom, Berlin, Deutschland
- TRIS: Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Triton X-100: Roth, Karlsruhe, Deutschland

Abkürzungsverzeichnis

- ATRA: All-Trans-Retinolsäure
- Bp: Basenpaare
- CD: "Cluster of Differentiation" – Antigen zur Leukozytendifferenzierung
- c-DANN: komplementäre DNA
- CNTF: "Ciliary Neurotrophic Faktor" –
- CRP: C-Reaktives Protein
- Dex: Dexamethason
- DMEM: "Dulbeccos Modified Eagles Medium" - Zellkulturmedium
- DANN: Desoxyribonukleinsäure
- DNGFR: "Deleted Nerve Growth Factor Receptor" - (intrazellulär) Deletierter Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor
- ECL: "Enhanced Chemoluminescence" – Verstärkte Chemolumineszenz
- env: "envelope" – membranständiges retrovirales Glykoprotein
- FCS: Fötale Kälberserum
- FITC: Fluorescein-Isothiocyanat
- FGF: "Fibroblast Growth Factor" – Fibroblasten-Wachstumsfaktor
- FGFR: "Fibroblast Growth Factor Receptor" – Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptor
- FTI: Farnesyltransferaseinhibitor
- Gag: "Group Specific Antigen" – Gruppenspezifisches Antigen (Retrovirusstrukturprotein)
- G-CSF: Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor
- GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
- GndHCL: Guanidinhydrochlorid
- HIV: Humanes Immundefizienzvirus
- HPLC: "High Pressure Liquid Phase Chromatography" - Hochdruckflüssigphasenchromatografie
- Ig: Immunglobulin
- IGF: "Insulin-like Growth Factor" – Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
- IL-6: Interleukin-6
- IL-7: Interleukin-7
- IL-10: Interleukin-10

- IL-11: Interleukin-11
- IPTG: Isopropyl beta-D-1-Thiogalactopyranosid
- IHRES: Interne Ribosomale Eintrittsstelle
- JAK: Januskinase
- KMSZ: Knochenmarkstromazellen
- LIF: "Leukemia Inhibitory Factor" -
- LTR: "Long Terminal Repeat" – lange terminale Wiederholung (retrovirale Promoter-/Enhancersequenzen)
- MACS: "Magnetic Cell Sorter" - Magnetischer Zellsortierer
- MAPK: Mitogenaktivierte Proteinkinase
- MGUS: Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
- m-RNA "messenger RNA" – Boten-RNA
- Mo-MuLV Moloney-Murines Leukämievirus
- µg: Mikrogramm
- Na-Pyruvat: Natriumpyruvat
- Ng: Nanogramm
- Oligo-dT: Desoxythymidin-Oligonukleotid
- PAGE: Polyacrylamidgelelektrophorese
- PBS: "Phosphate Buffered Saline" – Phosphat-Salz-Puffer
- PCR: Polymerasekettenreaktion
- PI: Propidiumiodid
- Pol: Polymerase (retroviral)
- RNA: Ribonukleinsäure
- RT-PCR: Reverse Transkriptase–Polymerasekettenreaktion
- SANT7: Superantagonist 7
- SANT7mH: Superantagonist 7 mit kombiniertem mycHis-Erkennungspeptid (c-terminal)
- SCID: Schwere Kombinierte Immundefizienz
- SDS: Sodiumdodecylsulfat
- STAT: "Signal Transducer and Activator of Transcription" – Signaltransduzierer und Transkriptionsaktivator
- TGF: "Tumor Growth Factor" – Tumor-Wachstumsfaktor
- TNF: Tumor-Nekrosefaktor
- VEGF: "Vascular Endothelial Growth Factor" -

- VPC: Virusproduzierende Zelllinie

Lebenslauf

- Geboren am 18.07.1970 in Braunschweig
- Abitur am 11.05.1989 in Bühl/Baden
-
- Beginn Medizinstudium an der Universität Heidelberg im April 1992
- Ärztliche Vorprüfung im April 1994 in Heidelberg
- Erster Teil der Ärztlichen Prüfung im April 1995 in Heidelberg
- Umzug nach Berlin im Mai 1995, Fortsetzung des Studiums an der Freien Universität Berlin
- Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung im August 1998
- Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung im November 1999
- Beginn der Berufstätigkeit als AiP an der Röbert-Rössle Klinik Berlin-Buch
- Übernahme als Assistenzarzt an der Röbert-Rössle Klinik Berlin-Buch im Juli 2001 bis Dezember 2003

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Dirk Hönemann