

**Einfluss der Hedgehog-Inhibitoren Cyclopamin und Vismodegib auf  
das Apoptoseverhalten von Multiplen Myelomzellen *in vitro***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Simon Limbach**  
aus Siegburg  
2014

Angefertigt mit Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Peter Brossart
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Sven Perner

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.08.2014

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III – Innere Medizin mit den Schwerpunkten  
Hämatologie, Onkologie und Rheumatologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Brossart

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>6</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>9</b>
1.1	Das Multiple Myelom .....	9
1.1.1	Definition und Pathogenese .....	9
1.1.2	Klinik.....	13
1.1.3	Diagnostik und Einteilung .....	14
1.1.4	Therapie und Prognose.....	18
1.2	Der Hedgehog-Signalweg .....	21
1.2.1	Entdeckung und Funktion der Hedgehog-Genfamilie.....	21
1.2.2	Biosynthese und Modifikation des Sonic-Hedgehog-Proteins (ShhP).....	22
1.2.3	Signalmoleküle/-weiterleitung im Hedgehog-Signalweg.....	23
1.2.4	Der Hedgehog-Signalweg in der Tumorentstehung .....	25
1.2.5	Hedgehog-Signalweg-Inhibitoren .....	27
1.2.5.1	Cyclopamin .....	28
1.2.5.2	Vismodegib .....	29
1.2.6	Untersuchungen des Hedgehog-Signalwegs beim Multiplen Myelom.....	30
1.3	Ziele und Fragestellungen der Arbeit .....	32
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>34</b>
2.1	Material .....	34
2.1.1	Geräte .....	34
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	35
2.1.3	Zelllinien .....	36
2.1.4	Reagenzien .....	36
2.1.5	Kits .....	38
2.1.6	Medien und Antibiotika .....	38
2.1.7	Puffer und Lösungen .....	38
2.2	Methoden .....	40
2.2.1	Zellkultur.....	40
2.2.1.1	Zelllinien.....	40
2.2.1.2	Zellzahlbestimmung .....	40

2.2.1.3	Einfrieren von Zellen .....	41
2.2.2	Isolierung von nativen B-Lymphozyten.....	41
2.2.2.1	Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation .....	41
2.2.2.2	X-VIVO 20-Adhäsion .....	42
2.2.2.3	Magnetische Zellseparation (MACS®) .....	42
2.2.3	Durchflusszytometrie .....	43
2.2.4	Propidiumiodid (PI) – Färbung.....	44
2.2.5	Untersuchung des Apoptoseverhaltens von Multiplen Myelomzellen.....	45
2.2.5.1	Behandlung von Multiplen Myelomzellen mit Cyclopamin/Vismodegib .....	45
2.2.5.2	Behandlung von nativen CD19 <sup>+</sup> -B-Lymphozyten mit Cyclopamin/ Vismodegib .....	47
2.2.5.3	Behandlung von Multiplen Myelomzellen mit Cyclopamin/Vismodegib und weiteren therapeutischen Substanzen .....	48
2.2.6	Herstellung von Gesamtzellproteinlysaten .....	50
2.2.7	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure.....	51
2.2.8	Caspase 3-Aktivitätsuntersuchung.....	51
2.2.9	Statistik.....	52
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
3.1	Auswertung der Ansätze zum Apoptoseverhalten von Myelomzelllinien.....	53
3.1.1	Behandlung von AMO1 mit Cyclopamin/Vismodegib .....	53
3.1.2	Behandlung von KMS11 mit Cyclopamin/Vismodegib.....	55
3.1.3	Behandlung von U266 mit Cyclopamin/Vismodegib.....	56
3.1.4	Behandlung von CD19 <sup>+</sup> -B-Lymphozyten mit Cyclopamin/Vismodegib.....	58
3.2	Auswertungen der Caspase 3-Aktivitätsuntersuchung .....	59
3.2.1	Caspase 3-Aktivität nach Behandlung mit Cyclopamin .....	60
3.2.2	Caspase 3-Aktivität nach Behandlung mit Vismodegib .....	60
3.3	Auswertung der Kombinationsbehandlung von Cyclopamin/Vismodegib mit weiteren therapeutischen Substanzen .....	61
3.3.1	Additiver Effekt von Bortezomib in Kombination mit Cyclopamin oder Vismodegib .....	62
3.3.2	Lenalidomid hat keinen additiven Effekt .....	63
3.3.3	Auch NVP-BEZ235 bewirkt keinen zusätzlichen additiven Effekt.....	65

<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>67</b>
4.1	Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung .....	77
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>80</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>99</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ABCG</b>	ATP-binding cassette sub-family G
<b>Akt</b>	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog
<b>AMC</b>	7-Amino-4-methylcumarin
<b>BCA</b>	Bicinchoninsäure
<b>Bcl</b>	B-cell lymphoma
<b>βTrCP</b>	Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase
<b>BSA</b>	Bovin Serum Albumin
<b>BSG</b>	Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit
<b>CAV</b>	Caveolin
<b>CCND</b>	Cyclin D
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>CDKN</b>	Cyclin-dependent kinase inhibitor
<b>CK1</b>	Caseinkinase 1
<b>C-MAF</b>	Muscoloaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog C
<b>DEVD</b>	Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure
<b>Dhh</b>	Desert-Hedgehog
<b>Disp</b>	Dispatched
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DSH</b>	Dishevelled
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immunosorbent assay
<b>EZM</b>	Extrazellulärmatrix
<b>FACS</b>	Fluorescence activated cell sorting
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum
<b>FDA</b>	U.S. Food and Drug Administration
<b>FGFR</b>	Fibroblast growth factor receptor
<b>FISH</b>	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
<b>FL</b>	Fluorezenzkanal

<b>FSC</b>	Forward Scatter
<b>GFR</b>	Glomeruläre Filtrationsrate
<b>Gli</b>	Glioma-associated oncogene homolog
<b>GPT</b>	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$
<b>Hh</b>	Hedgehog
<b>HPI</b>	Hedgehog pathway inhibitor
<b>ICAM</b>	Intercellular adhesion molecule
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IGF</b>	Insuline-like-growth-factor
<b>Ihh</b>	Indian-Hedgehog
<b>IL</b>	Interleukin
<b>INF</b>	Interferon
<b>IRF</b>	Interferon regulatory factor
<b>ISS</b>	Internationales Staging System
<b>JAK</b>	Januskinase
<b>KRAS</b>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
<b>LDH</b>	Lactatdehydrogenase
<b>LFA</b>	Lymphocyte function-associated antigen
<b>MACS</b>	Magnetische Zellseperation
<b>MAFB</b>	Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MEK</b>	Mitogen-activated protein kinase kinase
<b>MGUS</b>	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
<b>MM</b>	Multiples Myelom
<b>MMSET</b>	Multiple myeloma set domain
<b>MP</b>	Melphalan/Prednison
<b>MPT</b>	Melphalan/Prednison/Thalidomid
<b>mTOR</b>	mammalian Target of Rapamycin
<b>MYC</b>	„Myelozytomatose“-Gen
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<b>NRAS</b>	Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog

<b>PBS</b>	Phosphat gepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase-chain-reaction
<b>PI</b>	Propidiumiodid
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PMSF</b>	Phenylmethanesulfonylfluorid
<b>Ptch</b>	Patched
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositide 3-kinase
<b>Raf</b>	Rat fibrosarcoma
<b>Ras</b>	Rat sarcoma
<b>Rho</b>	Rhodopsin
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>Rock</b>	Rhodopsine-associated kinase
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SDS</b>	Natrium-dodecylsulfat
<b>Shh</b>	Sonic-Hedgehog
<b>ShhP</b>	Sonic-Hedgehog-Protein
<b>SKF</b>	Skiff
<b>Smo</b>	Smoothened
<b>SSC</b>	Side Scatter
<b>STAT</b>	Signal transducers and activators of transcription
<b>SUFU</b>	Supressor of Fused
<b>TGF</b>	Transforming growth factor
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>TP53</b>	Tumor Protein 53
<b>VCAM</b>	Vascular cell adhesion molecule
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>VMP</b>	Melphalan/Prednison/Bortezomib
<b>VLA</b>	Very late antigen
<b>Wnt</b>	Wingless (Wg) and Int-gene
<b>zVAD-FMK</b>	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethylketone



## **1. Einleitung**

In der heutigen Gesellschaft stehen Tumorerkrankungen mit ca. 26 % immer noch auf Platz zwei der häufigsten Todesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2012). Auch wenn das Multiple Myelom hierbei nur etwa 1-2 % aller Tumoren ausmacht, so gilt diese hämatologische Erkrankung immer noch als unheilbar und fordert deutschlandweit jährlich mehr als 3600 Tote (Lamerz, 2012; Robert Koch-Institut, 2013; Straka et al., 2012a). Europaweit liegt die Inzidenz des Multiplen Myeloms altersadaptiert bei 4-5 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern (Onkopedia, 2011). Trotz deutlicher Verbesserung der Prognose in den letzten zehn Jahren, vor allem durch den Einsatz von Immunmodulatoren und Proteasominhibitoren, ist die Therapie des Multiplen Myeloms nicht kurativ. Daher ist die Suche und Forschung nach weiteren therapeutischen Substanzen von hohem wissenschaftlichen und klinischen Interesse (Graf et al., 2012; Straka et al., 2012a).

In der vorliegenden Doktorarbeit soll durch die Inhibition des Hedgehog-Signalweges eine weitere Option in der Bekämpfung des Multiplen Myeloms untersucht werden. Dabei soll die Einleitung zunächst einen allgemeinen Überblick über die heutige Auffassung der Pathogenese und die derzeit gängigsten Therapieformen der Erkrankung geben.

### **1.1 Das Multiple Myelom**

#### **1.1.1 Definition und Pathogenese**

Das Multiple Myelom ist definiert als eine Plasmazellneoplasie mit maligner Proliferation klonaler, terminal differenzierter B-Lymphozyten (Plasmazellen) im Knochenmark. In der Mehrzahl der Fälle führt dies zur Bildung eines identischen, monoklonalen Eiweißes (Paraprotein mit monoklonalen Leichtketten) (Diebold et al., 2012).

Um die Pathogenese dieser hämatologischen Erkrankung zu verstehen, ist es wichtig sich zunächst die physiologische B-Zell- bzw. Plasmazellentwicklung zu vergegenwärtigen. Während der B-Zellreifung kommt es mehrfach zu einer Umlagerung von Keimbahngenen, die sowohl für den variablen Teil der schweren, als auch für den der leichten Immunglobulinkette kodieren. Bei dieser sogenannten V(D)J-Rekombination werden

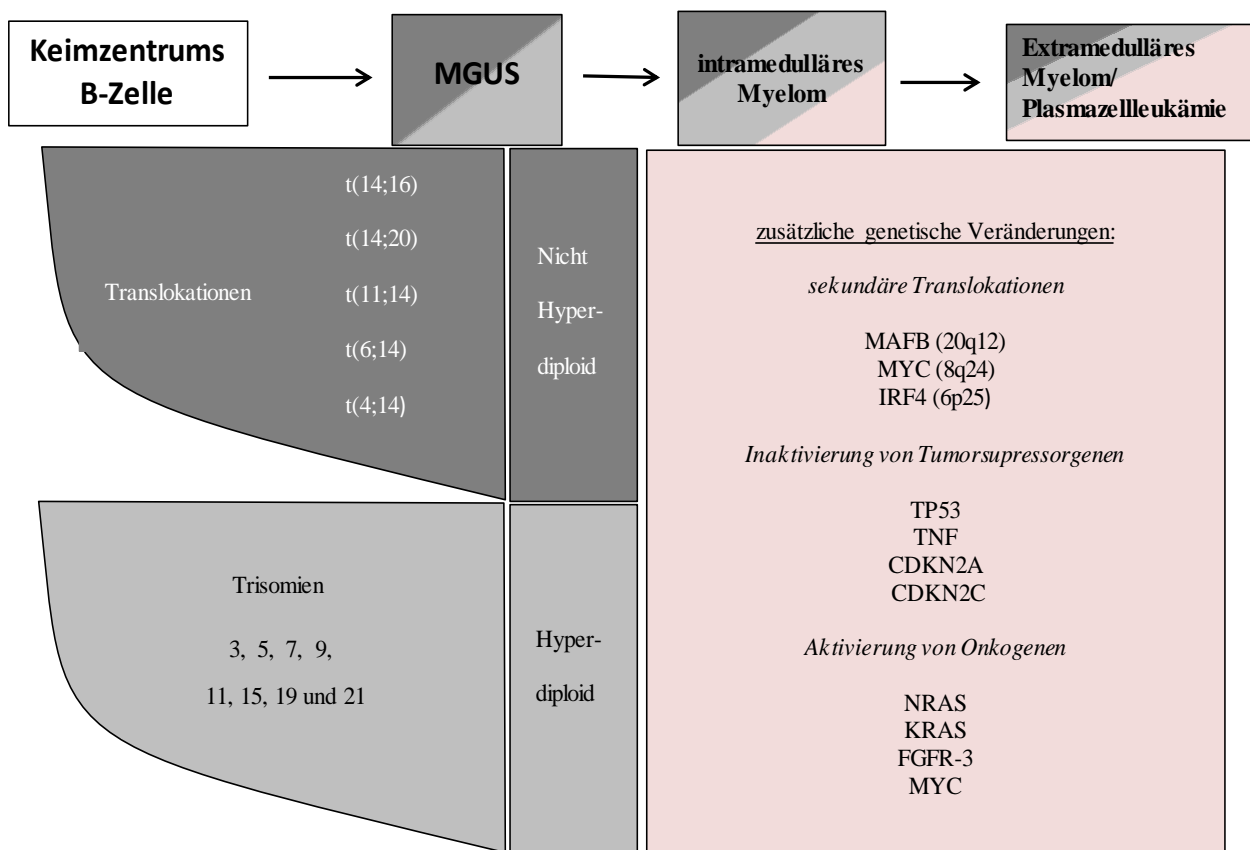
die Gensegmente (V, D, J), von denen jeweils mehrere Varianten existieren, neu kombiniert, wodurch die für die Immunglobuline wichtige Antigenvielfalt entsteht.

Zusätzlich kommt es im konstanten Teil der schweren Kette zum „Isotypen-Switch“, der zum Wechsel der Immunglobulinklasse von IgM zu IgG oder IgA (selten IgD/IgE) führt und ebenfalls auf Umlagerungen von DNA-Segmenten basiert (Schmidmaier et al., 2012).

Diese Vielzahl von physiologischen Rekombinationen bietet jedoch auch eine Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Translokationen mit Genen anderer Chromosomen, welche die Entstehung von Karzinomen begünstigen können. So beobachtet man beim Multiplen Myelom maligne Translokationen, insbesondere mit dem Promotor der schweren Immunglobulinkette auf Chromosom 14, die u.a. für eine vermehrte Expression von proliferativen und anti-apoptotischen Proteinen sorgen (Schmidmaier et al., 2012). Im Detail werden derzeit fünf myelomtypische, wiederholt auftretende Translokationen für die Tumorgenese der Krankheit verantwortlich gemacht. Dazu zählen t(14;16) (C-MAF), t(14;20) (MAFB), t(11;14) (Bcl-1, Cyclin D1), t(6;14) (Cyclin D3) und t(4;14) (FGFR-3 und MMSET). Seltener sind auch die Translokationen t(8;14) (C-MYC) und t(14;18) (Bcl-2) zu finden. Fehlen diese Translokationen, so können stattdessen in den meisten Fällen hyperdiploide Chromosomenzahlen, insbesondere Trisomien (oder auch Monosomien) der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 nachgewiesen werden, die ebenfalls auf eine genetische Instabilität beim Multiplen Myelom hinweisen (Anderson und Carrasco, 2011; Palumbo und Anderson, 2011; Schmidmaier et al., 2012).

Sowohl die hyperdiploiden Chromosomen als auch die beschriebenen Translokationen spielen jeweils eine zentrale Rolle in der frühen Karzinogenese und können bereits beim MGUS (Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz) nachgewiesen werden. Das MGUS gilt als asymptotische Vorstufe des Multiplen Myeloms (Kyle et al., 2002; Schmidmaier et al., 2012). In einer neueren Studie konnten Landgren et al. (2009) nachweisen, dass dieses MGUS stets einem Multiplen Myelom vorausgeht, wobei von einer konstanten Transformationsrate von 1 % pro Jahr ausgegangen wird. Da sich jedoch nicht aus jedem MGUS ein Multiples Myelom entwickelt, nimmt man heute an, dass zusätzliche genetische Abberationen auftreten müssen, die sowohl die Transformation als auch das weitere Fortschreiten der Erkrankung bestimmen. Hierfür werden neben sekundären Translokationen mit Involvierung von MAFB (20q12), MYC (8q24)

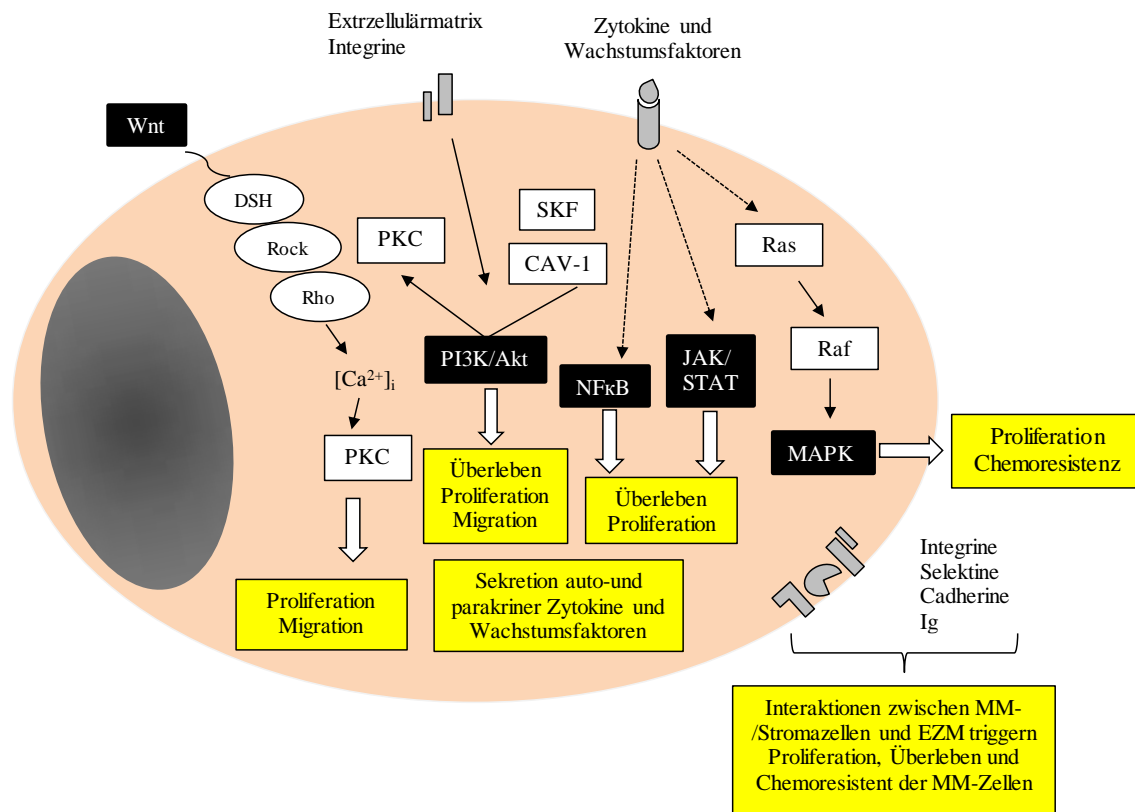
oder IRF4 (6p25) insbesondere auch Mutationen verantwortlich gemacht, die zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (u.a. TP53, TNF, CDKN2A, CDKN2C) oder zur Aktivierung von Onkogenen (u.a. NRAS, KRAS, FGFR-3, MYC) führen (Anderson und Carrasco, 2011; Palumbo und Anderson, 2011). Des Weiteren werden in neueren Studien auch epigenetische Veränderungen (microRNA, Methylierung) für die Genese der Erkrankung diskutiert (Roccaro et al., 2009).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der mehrschrittigen Pathogenese des Multiplen Myeloms.** Translokationen und Hyperdiploidie als frühe genetische Ereignisse bei der Myelompathogenese. Zusätzliche genetische Veränderungen (sekundäre Translokationen, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder Aktivierung von Onkogenen) bestimmen sowohl die Transformation als auch das weitere Fortschreiten der Erkrankung (modifiziert nach Schmidmaier et al., 2012).

Die Folgen dieser vielfältigen genetischen und epigenetischen Veränderungen zeigen sich insbesondere in der konstitutiven Aktivierung charakteristischer Signalwege, die sowohl das Apoptoseverhalten als auch die Proliferation und die Chemoresistenz von Myelomzellen bestimmen. Hierbei sind mit dem PI3K/Akt-Signalweg, dem

Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalweg, dem NFκB-Signalweg, dem JAK/STAT-Signalweg und dem Wnt-Signalweg die wichtigsten derzeit im Multiplen Myelom beschriebenen Signalwege zu nennen (Palumbo und Anderson, 2011; Schmidmaier et al., 2012).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der wichtigsten intrazellulären Signalwege im Multiplen Myelom.** Mit dem PI3K/Akt-Signalweg, dem Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalweg, dem NFκB-Signalweg, dem JAK/STAT-Signalweg und dem Wnt-Signalweg sind potentielle Therapieziele im Multiplen Myelom aufgezeigt (modifiziert nach Podar et al., 2009).

Anhand von neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen zeigt sich jedoch, dass die Betrachtung von onkogenen Ereignissen, die zur konstitutiven Aktivierung von Signalwegen führen, alleine nicht ausreicht, um die komplexe Pathogenese, insbesondere mit dem Übergang vom MGUS zum Multiplen Myelom, vollständig zu erklären. Vielmehr steht heute fest, dass, neben den genetischen Veränderungen, vor allem auch die Umgebung des Tumors, in diesem Falle das Knochenmarksmilieu, die Entwicklung und Progression des Myeloms entscheidend mitbeeinflusst (Podar et al., 2009). So sind

Myelomzellen in der Lage an Stromazellen und der Extrazellulärmatrix (EZM) des Knochenmarks zu adhären, wodurch es zu Wechselwirkungen und gegenseitiger Stimulation der beteiligten Zellen kommt. Es ist davon auszugehen, dass es über diese Zell-Zell/Zell-Matrix-Interaktionen ebenfalls zu einer verstärkten Aktivierung der genannten Signalwege und somit auch zu den beschriebenen proliferativen und anti-apoptischen Effekten kommt. Dabei können diese Effekte entweder direkt über Adhäsionsmoleküle (u.a. LFA1, VLA4, ICAM1, VCAM1) oder aber indirekt durch die Ausschüttung von Zytokinen vermittelt werden. Neben dem Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) oder dem Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) wird hierbei insbesondere dem Interleukin-6 (IL-6), welches überwiegend durch die Knochenmarksstromazellen gebildet wird, eine ganz zentrale Rolle für das Überleben von Myelomzellen zugeschrieben (Schmidmaier et al., 2012). Außerdem konnte, wie in vielen anderen Malignomen, auch im Multiplen Myelom eine gesteigerte Ausschüttung des Vascular endothelial growth factor (VEGF) nachgewiesen werden, das über den Vorgang der Neoangiogenese ebenfalls eine vermehrte Proliferation und auch Metastasierung des Tumors begünstigt (Rajkumar et al., 2002). Zusammenfassend lässt sich die Pathogenese des Multiplen Myeloms folglich durch ein komplexes Zusammenspiel von genetischen Veränderungen unter Mitbeteiligung vielfältiger Umgebungsfaktoren im Knochenmarksmilieu beschreiben, die zu Aktivierung verschiedener myelomtypischer Signalwege führen. Dieses Zusammenspiel und die Tatsache, dass die Aberrationen im Genom mit fortschreitender Pathogenese zunehmen, unterstreicht die molekulare Heterogenität dieser Erkrankung und somit die Schwierigkeit eines einheitlichen therapeutischen Vorgehens (Schmidmaier et al., 2012).

### **1.1.2 Klinik**

Während das MGUS definitionsgemäß eine asymptomatische Vorstufe des Multiplen Myeloms darstellt, zeigt sich auch dieses im frühen Stadium häufig noch symptomlos mit allenfalls uncharakteristischen Allgemeinsymptomen (Müdigkeit, Schwäche, Leistungsminderung, Gewichtsabnahme, Nachtschweiß, subfebrile Temperaturen), die nicht zwingend auf ein malignes Geschehen hindeuten. Als erstes relativ spezifisches Zeichen und häufigste klinische Erstmanifestation gelten dagegen fluktuierende, belastungsabhängige Knochenschmerzen, die vorwiegend im Bereich der Brust oder der Wir-

belsäule angesiedelt sind (Abedinpour et al., 2012). Zur richtigen Diagnosestellung führt in vielen Fällen jedoch erst das Auftreten von myelomtypischen Komplikationen, die insbesondere in späteren Stadien das klinische Bild und den weiteren Verlauf der Erkrankung bestimmen. So kommt es durch die Ausbreitung von Plasmazellnestern im Knochenmark vermehrt zu Spontanfrakturen in den befallenen Knochen und durch den gesteigerten Knochenabbau eventuell zu symptomatischen Hyperkalzämien. Des Weiteren führt die maligne Vermehrung der Plasmazellen zu einer Verdrängung des blutbildenden Knochenmarks, was eine Knochenmarksinsuffizienz mit Bi- oder Panzytopenie bedingen kann. Als Folge der Beeinträchtigung der medullären Hämatopoese zeigt sich in den meisten Fällen sowohl eine symptomatische Anämie als auch ein vermehrtes Auftreten von Infektionen. Dabei ist die erhöhte Infektanfälligkeit, neben einer eventuellen Leukopenie, insbesondere der Entstehung eines sekundären Antikörpermangels geschuldet. Die exzessive Ausschüttung von Paraproteinen durch die malignen Plasmazellklone bedingt einerseits eine geringere Konzentration der normalen Immunglobuline (Antikörpermangel) und andererseits ein Hyperviskositätssyndrom, das über die Auslösung von Durchblutungsstörungen zu neurologischen, ophthalmologischen oder auch kardiologischen Schäden führen kann (Abedinpour et al., 2012). Die häufigsten sekundären Organschäden beim Multiplen Myelom stellen jedoch mit 20-50 % Nierenerkrankung dar, wobei die Cast-Nephropathie („Myelomniere“) und die AL-Amyloidose zu den renalen Hauptmanifestationsformen zählen, da monoklonale Leichtketten vor allem über die Niere ausgeschieden werden (Schönermarck et al., 2012). Als weitere in der Literatur beschriebene Komplikationen sind zudem Polyneuropathien, Koagulopathien, nicht ulzerierende Hautveränderungen und das Auftreten von Zweitneoplasien zu nennen (Abedinpour et al., 2012; Graf et al., 2012).

### **1.1.3 Diagnostik und Einteilung**

Für eine leitliniengerechte Behandlung des Multiplen Myeloms ist zunächst eine sorgfältig betriebene Diagnostik notwendig, um die Erkrankung festzustellen und sie einem präzisen Stadium zuzuordnen, welches für eine richtige Therapieplanung und Prognoseeinschätzung unentbehrlich ist. Im klinischen Alltag stützt sich dabei das diagnosti-

sche Konzept auf drei Säulen – die klinisch-chemische Diagnostik, die bildgebende Diagnostik und die Knochenmarksdiagnostik.

Häufig wird im Rahmen von allgemeinen Vorsorgeuntersuchungen bei Patienten zunächst ein sogenannter schmalbasiger M-Gradient in der Eiweißelektrophorese des Serums festgestellt, der eine monoklonale Gammopathie vermuten lässt. Um nun den Verdacht eines Multiplen Myeloms zu bestätigen bzw. dieses von einem weniger malignen, schleichenden (smoldering) Myelom oder einem MGUS abzugrenzen, sind weitere diagnostische Schritte notwendig (Onkopedia, 2011). Ein schleichendes (smoldering) Myelom erfüllt dabei die diagnostischen Kriterien eines Multiplen Myeloms, doch bleibt es über Jahre hinweg asymptomatisch ohne myelomtypische klinische Zeichen.

So wird als weiterführender Laborparameter neben der allgemeinen Blut- und Urinuntersuchung (Blutbild mit Differentialblutbild, Elektrolyte (Natrium, Kalium, Kalzium), Nierenretentionsparameter (Kreatinin incl. GFR, Harnstoff), Gesamteiweiß und Albumin, BSG, LDH, GPT,  $\beta$ 2-Mikroglobulin, Leichtketten (Bence-Jones-Proteine) im Serum, Spontan- und 24 h-Urin) insbesondere eine Immunfixationselektrophorese zur Charakterisierung und Bestätigung eines monoklonalen Schwer- und Leichtkettentyps im Serum und Urin empfohlen. Zudem sollte zur Abschätzung der Konzentration des monoklonalen Immunglobulins und zur Beurteilung der polyklonalen Antikörper eine quantitative Bestimmung der Immunglobuline G, A und M erfolgen. Diese sind auch als individuelle Verlaufsparemeter für die Tumormasse und das Therapieansprechen von entscheidender klinischer Relevanz. Unter diesem Gesichtspunkt hat auch die quantitative Bestimmung von Kappa- und Lambda-Leichtketten in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen, so dass auch diese, inklusive der Berechnung des Kappa/Lambda-Leichtkettenquotienten, mittlerweile als wichtige diagnostische Hilfsmittel gelten (Onkopedia, 2011; Wick et al., 2012).

Des Weiteren wird zur Darstellung von osteolytischen Herden im Knochen, die durch die Vermehrung und Vergrößerung von sogenannten „Plasmazellnestern“ entstanden sind, eine Röntgenuntersuchung nach „Pariser Schema“ (Schädel, Becken, Achsenskelett, Rippen thoraces, Oberarm- und Oberschenkelknochen beidseits) oder aber direkt eine niedrig-dosierte Computertomographie des Skeletts empfohlen. Bei Verdacht auf extramedulläre Manifestation kann auch eine Kernspintomographie indiziert sein (Onkopedia, 2011).

Gesichert werden kann die Diagnose des Multiplen Myeloms durch eine Knochenmarkspunktion aus dem Beckenkamm, wobei der Nachweis der klonalen Plasmazellen entweder auf immunhistologischem oder immunzytologischem Wege erfolgt. Außerdem kann hierbei Material für zytogenetische Analysen gewonnen werden, sodass über konventionelle Chromosomen- oder FISH- sowie über PCR-Analysen genetische Veränderungen der Zellen aufgedeckt werden können. Denn, wie unter 1.1.1 beschrieben, können diese Aberrationen die Pathogenese des Myeloms und nicht zuletzt die Prognose entscheidend mitbestimmen (Onkopedia, 2011; Schmidmaier und Franke, 2012).

Im Folgenden sind drei Abbildungen aufgeführt, die mögliche Einteilungsformen des Multiplen Myeloms darstellen. Dabei zeigt Abbildung 3 die diagnostischen Kriterien zur Abgrenzung des Multiplen Myeloms von seinen unterschiedlichen Varianten. In Abbildung 4 und 5 sind dagegen zwei anerkannte Stadieneinteilungen des Multiplen Myeloms dargestellt, die derzeit im klinischen Alltag bei der Prognoseabschätzung und Therapieentscheidung zur Anwendung kommen.



Diagnose	Multiples Myelom	Schleichendes Myelom	MGUS <sup>1</sup>	Solitäres Plasmozytom	Plasmazell-Leukämie
<b>Kriterien</b>					
Klonale Plasmazellen im Knochenmark	≥ 10 %	≥ 10 %	< 10 %	< 10 %	
	<u>und</u>	<u>und / oder</u>	<u>und</u>	<u>und</u>	
Krankhaftes Eiweiß im Serum	nachweisbar	≥ 30 g / l	< 30 g / l	nicht nachweisbar	
	<u>und / oder</u>			<u>und</u>	
Krankhaftes Eiweiß im Urin	nachweisbar			nicht nachweisbar	
	<u>und</u>	<u>und</u>	<u>und</u>	<u>und</u>	
Schäden im Körper (CRAB Kriterien <sup>2</sup> )	nachweisbar	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	
				<u>und</u>	
andere Krankheitszeichen				einzelner Knochenherd	≥ 2 x 10 <sup>9</sup> / l klonale Plasmazellen im Blut
				<u>und</u>	<u>und / oder</u>
				klonale Plasmazellen gesichert	> 20 % Plasmazellen im Blutblut

**Abb. 3: Diagnosekriterien zur Unterscheidung des Multiplen Myeloms von seinen unterschiedlichen Varianten.** <sup>1</sup>MGUS – monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz; <sup>2</sup>CRAB-Kriterien - Hyperkalzämie und/oder Niereninsuffizienz und/oder Anämie und/oder osteolytische Knochendestruktion (Onkopedia, 2011).

Stadium	Kriterien	Definition	Medianes Überleben [Monate]
I	Niedriges β2-Mikroalbumin	β2-Mikroalbumin < 3,5 mg/L Albumin ≥ 3,5 g/dl	62
II	Weder Stadium I noch III	β2-Mikroalbumin < 3,5 mg/L Albumin ≥ 3,5 g/dl <i>oder</i> β2-Mikroalbumin = 3,5 mg/L bis < 5,5 mg/L	44
III	Hohes β2-Mikroalbumin	β2-Mikroalbumin ≥ 5,5 mg/L	29

**Abb. 4: Internationales Staging System (ISS) des Multiplen Myeloms** (Greipp et al., 2005).

Stadium	Kriterien
I (niedrige Tumorzell- masse: < 0,6 x 10 <sup>12</sup> /m <sup>2</sup> )	<u>Erfüllung aller 4 Kriterien:</u> 1. Hb-Wert > 10 g/dl 2. Serum-Ca-Wert normal 3. Röntgenologisch normales Skelett oder nur eine solitäre Osteolyse 4. Geringe Konzentration monoklonaler Immunglobuline: a) IgG < 5 g/dl b) IgA < 3 g/dl c) Leichtketten im Urin: < 4 g/24 h
II	Weder zu Stadium I noch zu Stadium III passend
III (hohe Tumorzell- masse: > 0,6 x 10 <sup>12</sup> /m <sup>2</sup> )	<u>Eines oder mehrere der folgenden Kriterien:</u> 1. Hb-Wert < 8,5 g/dl 2. Serum-Ca-Wert erhöht 3. Fortgeschrittene osteolytische Knochenveränderungen 4. Hohe Konzentration monoklonaler Immunglobuline: a) IgG > 7 g/dl b) IgA > 5 g/dl c) Leichtketten im Urin: > 12 g/24 h
Zusatzstadium nach Nierenfunktion	A) Serum-Kreatinin < 2 mg/dl B) Serum-Kreatinin > 2 mg/dl

**Abb. 5: Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms nach Durie und Salmon (Herold, 2009).**

#### 1.1.4 Therapie und Prognose

Auch wenn eine vollkommene Heilung von Myelompatienten zum gegenwärtigen Zeitpunkt immer noch keine realistische Zielsetzung darstellt, konnte in den letzten zehn Jahren die Behandlung und die Prognose des Multiplen Myeloms durch die Entwicklung neuer Medikamente wie Bortezomib oder Lenalidomid (Thalidomid-Analogen) und neuer Therapieschemata deutlich verbessert werden. Als angestrebte Therapieziele gelten derzeit eine möglichst starke Zurückdrängung der Plasmazellklone mit dem Erreichen einer Komplettemission (kein monoklonales Protein in Serum und Urin; ≤ 5 % Plasmazellen im Knochenmark; Verschwinden von Weichteilplasmozytomen) und mit einem langen progressionsfreien Überleben. Des Weiteren stehen die Vermeidung bzw. die Kontrolle von myelomtypischen Komplikationen (u.a. Niereninsuffizienz, Infektionen, Polyneuropathien, Frakturen, Thrombosen) und darüber hinaus die Verbesserung von Mo-

bilität, Lebensqualität und körperlicher Leistungsfähigkeit im Vordergrund der therapeutischen Maßnahmen (Straka et al., 2012a).

Die Therapieindikation und die Wahl des geeignetsten Therapieverfahrens für das Multiple Myelom werden individuell getroffen und richten sich sowohl nach dem Stadium und dem Typ der Erkrankung, als auch nach Alter, Symptomatik und Gesundheitszustand des Patienten. So wird im Stadium I bzw. bei asymptomatischen Patienten in der Regel noch keine Therapie begonnen und ein abwartendes Verhalten mit regelmäßiger Labor-, Röntgen- und Knochenmarkskontrolle empfohlen („watch and wait“) (Onkopedia, 2011). Bei symptomatischen Patienten ist dagegen stets die Indikation zur Therapie gegeben, wobei sich die ausschlaggebende Symptomatik insbesondere anhand der sogenannten CRAB-Kriterien definieren lässt. Diese Kriterien umfassen Hyperkalzämie (C), Niereninsuffizienz (R), Anämie (A) und Knochenläsionen (B) – und stellen somit Endorganschäden dar, die auf direktem oder indirektem Wege durch den Tumor entstanden sind (Straka et al., 2012a).

Lange Zeit stellte eine reine Chemotherapie aus der Kombination von Melphalan und Prednison (MP) die wirksamste Therapie des Multiplen Myeloms für Patienten aller Altersklassen dar. Erst mit Einführung der autologen Stammzelltransplantation in den 1980er Jahren konnte eine erste wirkungsvolle Alternative zur alleinigen Chemotherapie angeboten werden, die auch heute noch als Standardtherapie für alle geeigneten Myelompatienten (guter Allgemeinzustand, keine schwerwiegenden Infektionen, keine relevanten Organschäden) gilt (Dietzfelbinger und Straka, 2012; Straka et al., 2012a). Bei dieser Therapieform werden dem Körper des Patienten Stammzellen aus dem Knochenmark (autologe Knochenmarktransplantation) oder aus dem peripheren Blut (autologe Blutstammzelltransplantation) entnommen und im Anschluss das restliche Knochenmark, inklusive der malignen Plasmazellen, durch eine Hochdosis-Melphalantherapie (200 mg/m<sup>2</sup>) zerstört. Schließlich führt die Reinfusion der Stammzellen zu einer relativ raschen Erholung des Knochenmarks mit einer kompletten und anhaltenden hämatopoetischen Rekonstitution (Straka et al., 2012b). Neben der autologen steht auch eine allogene Stammzelltransplantation zur Therapie des Multiplen Myeloms zur Verfügung, wobei hierbei die Stammzellen einem fremden, histokompatiblen Spender entnommen werden. Obwohl gezeigt werden konnte, dass das allogene Therapiekonzept, aufgrund des „Graft-versus-Myeloma-Effekts“ (Aktivität der mittransplantierten T- bzw.

NK-Zellen des Spenders, die sich gegen die Myelomzellen des Empfängers richten), in vielen Fällen sogar ein kuratives Potential besitzt, ist es im Vergleich zur autologen Stammzelltransplantation durch das gehäufte Auftreten von Abstoßungsreaktionen („Graft-versus-Host-Effekt“) mit einer erhöhten therapieassoziierten Morbidität und Mortalität verknüpft, sodass der Stellenwert dieser Therapieform kontrovers diskutiert und in der Regel nicht als Primärtherapie empfohlen wird (Hentrich et al., 2012; Straka et al., 2012a). Aufgrund des Bedarfs hoher Dosen Melphalan und der damit verbundenen enormen Belastung des Körpers kommt die autologe Stammzelltransplantation als Standardverfahren in der Regel nur bei Patienten mit einem Alter unter 70 Jahren und guten Organfunktionen in Frage. Bei rüstigen Patienten kann in Einzelfällen die Therapie jedoch auch im Alter über 70 Jahren sinnvoll sein – sollte dann aber mit einer niedrigeren Dosierung Melphalan (140 mg/m<sup>2</sup>) und, wenn möglich, im Rahmen von klinischen Studien erfolgen (Onkopedia, 2011; Straka et al., 2012a).

Für all diejenigen Patienten, bei denen die Durchführung einer Stammzelltherapie aufgrund von Alter, Komorbiditäten oder sonstigen Gegebenheiten nicht möglich ist, hat sich im letzten Jahrzehnt das Therapieangebot für das Multiple Myelom erheblich erweitert und verbessert. Durch die Entwicklung neuer Substanzen wie dem Proteasominhibitor Bortezomib und den Immunmodulator Lenalidomid (Thalidomid-Analogen mit verbessertem Nebenwirkungsprofil) kann heute die jahrzehntelang bestehende Kombinationstherapie aus Melphalan und Prednison um eine der neuen Substanzen ergänzt werden, was die Effektivität der Chemotherapie und damit die Langzeitprognose signifikant verbessert hat (Onkopedia, 2011; Straka et al., 2012a). Während sowohl die Kombination aus Melphalan, Prednison und Bortezomib (VMP) als auch diejenige aus Melphalan, Prednison und Thalidomid (MPT) bereits in der Primärtherapie bzw. Induktionstherapie des Multiplen Myeloms offiziell zur Verfügung stehen, ist Lenalidomid derzeit nur in Kombination mit Dexamethason nach vorausgegangener Therapie bzw. in der Rezidivtherapie zugelassen (Onkopedia, 2011). Die neuen Dreierkombinationen besitzen allerdings alle ein erhöhtes toxisches Potential, das ein vermehrtes Auftreten von Nebenwirkungen (u.a. Neuropathien, Thrombosen, Infektionen) bedingt, sodass individuell bei jedem Patienten vor Beginn der Therapie eine Nutzen-Risiko-Abwägung durchgeführt werden sollte. Für ältere multimorbide Patienten kann in diesem Zusammenhang auch die Verwendung von weniger intensiven Chemotherapeutika wie Ad-

ramycin, Bendamustin oder Cyclophosphamid in Betracht gezogen werden, um auf nebenwirkungsärmere Art und Weise zumindest Symptomatik und Allgemeinzustand zu verbessern (Straka et al., 2012a).

Weitere mögliche therapeutische Vorgehensweisen umfassen eine lokale Strahlentherapie oder eine Operation, deren Anwendung insbesondere bei lokalen extramedullären Plasmozytomen, aber auch als Prophylaxe bzw. Fixation von frakturgefährdeten Skelettanteilen zum Einsatz kommt. Darüber hinaus stellt die Supportivtherapie mit Kontrolle und adäquater Behandlung der weiteren myelomtypischen Komplikationen (u.a. Knochenschmerzen, Anämie, Hyperkalzämie, Infektion, Niereninsuffizienz, Hyperviskositäts- und Antikörpermangelsyndrom) einen bedeutsamen Eckpfeiler in der Therapie des Multiplen Myeloms dar. Hierbei sind neben der Gabe von Bisphosphonaten oder Blutkonserven auch intravenöse Substitutionen von IgG oder Plasmaseparationen als die wichtigsten ergänzende Therapiemaßnahmen zu nennen (Onkopedia, 2011).

Auf Grund der Ausschöpfung aller genannten therapeutischen Möglichkeiten hat sich die Prognose des Multiplen Myeloms in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert. Während unbehandelt die mediane Überlebenserwartung von Myelompatienten bei etwa sechs Monaten liegt, kann diese durch die neuen Kombinationschemotherapien auf über drei Jahre und durch eine Hochdosistherapie mit anschließender Stammzelltransplantation sogar auf bis zu fünf Jahren gesteigert werden. In Einzelfällen wird heute sogar von Lebensverlängerung bis zu zehn Jahren berichtet, was, trotz vieler Schwierigkeiten und Enttäuschungen, die intensive und stetige Forschung auf dem Gebiet des Multiplen Myeloms bestätigt (Dietzfelbinger und Straka, 2012).

## **1.2 Der Hedgehog-Signalweg**

### **1.2.1 Entdeckung und Funktion der Hedgehog-Genfamilie**

Ende der 1970er Jahre entdeckten Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus ein Gen in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, welches in der Embryonalentwicklung die Erstellung des richtigen Bauplans von Körperabschnitten kontrollierte. So zeigte eine Fruchtfliege bei Mutation des Gens eine veränderte, komplett behaarte Oberflächenstruktur, die vom Aussehen her an einen Igel erinnerte, was letztlich die Namensgebung des Gens bestimmte (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). Während in *Drosophila*

melanogaster nur ein Hedgehog-Gen existiert, konnten Anfang der 1990er Jahre in Vertebraten drei homologe Hedgehog-Gene (Sonic-/Indian-/Desert-Hedgehog) nachgewiesen werden, von denen heute bekannt ist, dass sie in unterschiedlichem Maße die Entstehung und Differenzierung verschiedener Organsysteme regulieren (Echelard et al., 1993). Dabei spielt das Sonic-Hedgehog-Gen (Shh) die größte Rolle u.a. in der Entwicklung des Zentralnervensystems, des Darms oder bei der Entstehung von Gliedmaßen (Echelard et al., 1993; Litingtung et al., 1998). Indian-Hedgehog (Ihh) ist dagegen vor allem bei der enchondralen Knochenbildung aktiv, während sich Desert-Hedgehog (Dhh) in der Gonadenentwicklung überexprimiert zeigt (Bitgood et al., 1996, Iwasaki et al., 1997). Die Hedgehog-Gene werden daher auch als Morphogene bezeichnet. Sie codieren die Bildung von extrazellulären Signalmolekülen – den Hedgehog-Proteinen, welche über den Aufbau eines Konzentrationsgradienten im Gewebe Zielgene aktivieren bzw. reprimieren, um so Wachstums- und Differenzierungsprozesse zu steuern (Ingham und McMahon, 2001).

### **1.2.2 Biosynthese und Modifikation des Sonic-Hedgehog-Proteins (ShhP)**

Da bislang von allen Hedgehog-Proteinen das Sonic-Hedgehog-Protein (ShhP) am besten untersucht wurde, sollen die Biosynthese und die Wege der Signaltransduktion anhand des ShhP erläutert werden.

Bevor das ShhP als extrazelluläres Signalmolekül fungieren kann, muss es mehrere Modifikationsschritte während der Biosynthese durchlaufen. Innerhalb der Zelle wird das ShhP zunächst als 45 kDa schweres Vorläuferprotein synthetisiert, welches durch einen autokatalytischen Prozess in eine 25 kDa schwere N-terminale und eine 20 kDa schwere C-terminale Domäne gespalten wird (Bumcrot et al., 1995). Während der C-terminale Rest die Proteaseaktivität inne hat und nach der Spaltung funktionslos wird, bildet die N-terminale Domäne den signalaktiven Anteil des Proteins. Dieser wird durch weitere Modifizierung mit hydrophoben Cholesterin- und Palmitoyl-Resten verknüpft, welche das aktive Signalprotein befähigen, extrazelluläre Interaktionen mit Zellmembranen einzugehen. Auf diese Weise können die für die Wirkung wichtigen Konzentrationsgradienten im Gewebe aufgebaut werden (Pepinsky et al., 1998; Porter et al., 1996). Im letzten Schritt

gelangt das fertige, lipidmodifizierte ShhP mit Hilfe von Dispatched (Disp), ein dem Patched (Ptch) strukturverwandtes Protein, in die Peripherie (Burke et al., 1999).

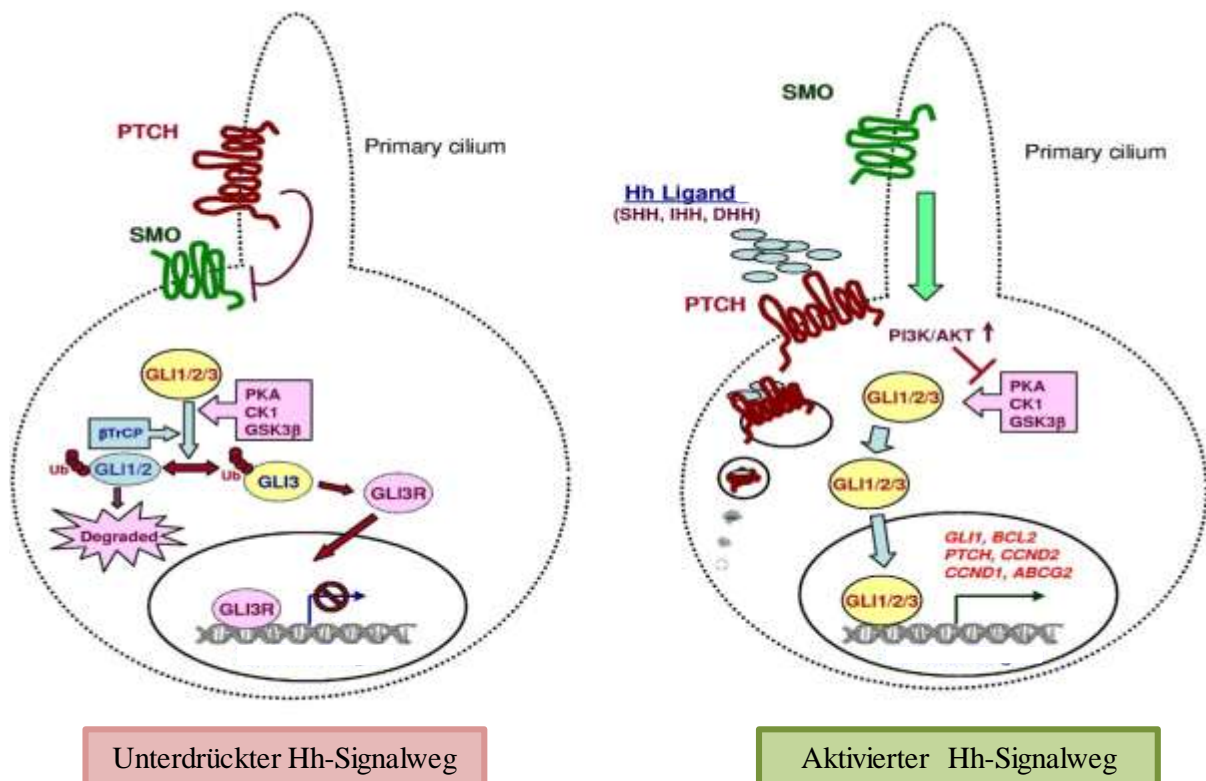
### **1.2.3 Signalmoleküle/-weiterleitung im Hedgehog-Signalweg**

Um nun die Wirkung auf eine Erfolgszelle auszuüben, bindet das aktive ShhP als Ligand an den Rezeptor Ptch, ein Protein mit zwölf Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Schleifen mit den ShhP-Bindungsstellen (Johnson et al., 1996). Neuere Studien haben ergeben, dass sich der Hauptteil der Ptch-Rezeptoren in den Membranen von Zellausstülpungen („primary cilium“) befindet, sodass man diese mittlerweile als den Hauptort der Hedgehog-Signalweitergabe betrachtet. Dies lässt darauf schließen, dass neben den Signalproteinen/-rezeptoren, auch der Aufbau und die Struktur der Zelle wichtige Bestandteile des Hedgehog-Signalweges sind (Casparly et al., 2007; Corbit et al., 2005; García-García et al., 2005).

Im ungebundenen Zustand inhibiert Ptch ein weiteres Signalmolekül, das Smoothened (Smo), ein Protein mit sieben Transmembrandomänen und Ähnlichkeiten eines G-Protein gekoppelten Rezeptors, welches durch die Inhibition in einem inaktiven zytosolischen Zustand gehalten wird (Philipp et al., 2008; Philipp und Caron, 2009). Bindet nun ein ShhP an Ptch führt dies zu einem intrazellulären „Switch“ zwischen Ptch und Smo. Während der Ptch-Ligand Komplex endozytiert wird und dadurch seine inhibierende Wirkung auf Smo verliert, verlagert sich Smo in die Zellmembran und wird aktiv (Corbit et al., 2005). Neuere, von Drosophila auf Vertebraten übertragende Studien lassen vermuten, dass hierbei eine Phosphorylierung von Smo und die Beteiligung von  $\beta$ -Arrestin notwendig sind (Chen et al., 2004).

Das aktive Smo-Protein ist nun in der Lage, den Transkriptionsfaktor Gli im Zytosol zu aktivieren, indem es dessen Bindung zu dem Retentionsprotein SUFU löst. Dadurch wird es Gli ermöglicht, in den Zellkern zu translozieren und dort Zielgene des Hedgehog-Signalweges zu aktivieren (Tukachinsky et al., 2010). Zu den Zielgenen von Gli zählen neben eigenen Genen des Hedgehog-Signalweges (Ptch, Gli1), insbesondere auch Apoptose (bcl2) und Zellzyklus regulierende Gene (CCND1, CCND2). Die Proteine der Gli-Familie stellen Transkriptionsfaktoren vom Zinkfinger-Typ dar, von denen drei Isoformen - Gli1, Gli2, Gli3 - existieren (Ok et al., 2012).

Durch Inaktivierung von Smo kommt es zur Bildung eines Gli-Degradationskomplexes in der Zelle. Zunächst werden alle Gli-Isoformen durch Proteinkinasen (u.a. Caseinkinase 1 (CK1), Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), Proteinkinase A (PKA)) phosphoryliert, anschließend durch die phosphorylations-abhängige E3-Ubiquitin-Ligase ubiquitiniert und letztlich dem Proteasom zugeführt. Während die als Aktivator des Hedgehog-Signalweges fungierenden Gli1- und Gli2-Isoformen im Proteasom komplett abgebaut werden, wird Gli3 nur partiell degradiert und wandert als Repressorform (Gli3R) in den Zellkern, um dort die Transkription der Hedgehog-Zielgene zu reprimieren (Huntzicker et al., 2006; Katoh und Katoh, 2006). Der Hedgehog-Signalweg ist somit in der Lage sich sowohl durch negative Feedback-Mechanismen (Ptch), als auch durch positive Feedback-Mechanismen (Gli1) selbst zu regulieren und seine Wirkung zu graduieren.



**Abb. 6: Schematische Darstellung des unterdrückten und des aktivierten Hedgehog-Signalweges.** In Abwesenheit des Hedgehog-Liganden lokalisiert sich Ptch ins „primary cilium“ und inhibiert das Signalmolekül Smo, welches nun nicht mehr in der Lage ist Gli-Transkriptionsfaktoren im Zytosol zu aktivieren. Hierdurch wird es diesen unmöglich gemacht, in den Zellkern zu translozieren, um dort Zielgene des Hedgehog-Signalweges (u.a. Ptch, Gli1, bcl2, CCND1, CCND2) zu aktivieren. In Anwesenheit des Hedgehog-Liganden verliert Ptch seine inhibierende Wirkung auf Smo und die Signalkaskade zur Aktivierung von Zielgenen des Hedgehog-Signalweges kann erfolgen (modifiziert nach Ok et al., 2012).



#### **1.2.4 Der Hedgehog-Signalweg in der Tumorentstehung**

Der Hedgehog-Signalweg stellt in der Übertragung von Fruchtfliege zum Menschen ein hochkonserviertes Transduktionsereignis dar, welches zusammen mit anderen Signalwegen (Wnt- /Notch-Signalweg) die Selbsterneuerung und Differenzierung von Zellen in der Embryonalentwicklung reguliert. Während der Signalweg im Erwachsenenalter in den meisten Geweben heruntergefahren wird, kann er in verletztem Gewebe wieder angeschaltet werden, um die Reparatur und Erneuerung von geschädigten Zellen voranzutreiben (Ingham und McMahon, 2001). Insbesondere in Stamm- und Vorläuferzellen wurden erhöhte Aktivitäten des Hedgehog-Signalweges nachgewiesen, was seine Bedeutung für Erhalt, Regeneration und Homöostase im Gewebe untermauert (Beachy et al., 2004).

In Anbetracht des großen Einflusses auf Zellproliferation, Selbsterneuerung und Apoptose, ist es daher nicht verwunderlich, dass eine Störung des Hedgehog-Signalweges zur Entstehung von Tumoren führen kann. So deckten Mitte der 1990er Jahre zwei Studien jeweils unabhängig voneinander Mutationen in Ptch-Genen bei Patienten mit Gorlin Syndrom (autosomal-dominant vererbtes Syndrom mit Auftreten zahlreicher Basalzellkarzinome im frühen Lebensalter sowie multiplen weiteren Fehlbildungen, insbesondere des Skelettsystems und des ZNS („Naevoides Basalzellkarzinomsyndrom“) auf (Altmeyer, 2010). Diese führen zu einem Verlust der Ptch-Funktion, verbunden mit einer Hyperaktivität des Hedgehog-Signalweges und erklären die Prädisposition dieser Patienten für Basalzellkarzinome, Medulloblastome oder Rhabdomyosarkome (Hahn et al., 1996; Johnson et al., 1996).

Bei der Suche nach weiteren Zusammenhängen zwischen Tumorentstehung und dem Hedgehog-Signalweg fand man weitere Mutationen auch in anderen Genen als Ptch. So deckten Studien neben Smo-Mutationen in sporadischen Basalzellkarzinomen auch Mutationen des SUFU-Gens in einzelnen Medulloblastomen auf, die jeweils zur konstitutiven Stimulierung des Signalweges führten (Taylor et al., 2002; Xie et al., 1998).

Obwohl mittlerweile auch in den meisten anderen Tumoren des Körpers ein aktiver Hedgehog-Signalweg nachgewiesen wurde, konnte hierfür in der Mehrzahl der Fälle keine Genmutation verantwortlich gemacht werden. Man nimmt daher heute an, dass Mutationen, die zu einer Liganden-unabhängigen Stimulierung im Hedgehog-Signalweg führen, eher eine Sonderstellung in der Tumorentstehung einnehmen, und entwickelte

neue Modelle, die eine Liganden-abhängige Stimulierung favorisieren (Bar et al., 2007; Dormoy et al., 2009; Karhadkar et al., 2004; Lin et al., 2010; Watkins et al., 2003). Grundlage dieser Modelle ist eine Überexprimierung des Hedgehog-Liganden, die in vielen Tumoren nachgewiesen werden konnte. Dabei lassen sich die Modelle, je nach Ursprungs- und Zielzelle des Liganden, weiter unterteilen. Für viele Karzinome u.a. in Prostata, Lunge oder Niere, aber auch für Leukämien und Glioblastome, wurde ein autokrines/juxtakrines Modell beschrieben, in denen die Tumorzelle den Hedgehog-Ligand selber produziert, um sich und auch die benachbarten Tumorzellen zu stimulieren (Bar et al., 2007; Dormoy et al., 2009; Karhadkar et al., 2004; Lin et al., 2010; Watkins et al., 2003).

Andere Autoren gehen dagegen von einem parakrinen Stimulierungsmodell der Tumorzelle aus, in welchem der Hedgehog-Ligand von Stromazellen im Umfeld des Tumors produziert wird und die Tumorzelle lediglich als Empfänger dient. Beweise für dieses Modell lieferten Untersuchung an B-Zell-Tumoren, die erhöhte Hedgehog-Ligand-Konzentrationen in Stromazellen von lymphatischem Gewebe nachwies. Sie zeigten, dass diese Stromazellen den Hedgehog-Ligand sekretierten, um Wachstum und Proliferation von Tumorzellen, sowohl in Leukämien als auch in Lymphomen oder Multiplen Myelomen, zu stimulieren (Blotta et al. 2012; Dierks et al., 2007).

Eine Modifizierung dieses parakrinen Modells wurde von Yauch et al. (2008) für Tumore in Kolon, Pankreas und Prostata vorgeschlagen. Hier konnten erhöhte Hedgehog-Ligand-Konzentration in Tumorzellen festgestellt werden, die jedoch nicht zu einer Gli1-Erhöhung führten. Folglich nahm man an, dass der Hedgehog-Ligand die Tumorzelle nicht autokrin stimulierte und vermutete einen indirekten Weg, in welchem der Ligand Stromazellen in der Umgebung des Tumors parakrin aktiviert, die daraufhin ihrerseits Wachstumsfaktoren ausschütten, um das Tumorstadium zu unterhalten (Yauch et al., 2008). Die genauen Wachstumsfaktoren sind zwar noch unbekannt, jedoch deuten ältere Studien darauf hin, dass eventuell der Insuline-like-growth-factor (IGF) oder auch der Vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) in diesem Modell beteiligt sind (Ingram et al., 2002; Pola et al., 2001).

Auch wenn diese neuen Modelle allesamt gute Erklärungen bieten, inwieweit der Hedgehog-Signalweg den Prozess der Tumorentstehung aufrecht erhält, bleibt die Frage der Ursache für die erhöhte Hedgehog-Liganden-Konzentration ungeklärt. Da, wie

bereits oben erwähnt, in der Mehrzahl der Tumore jegliche Nachweise von Mutationen in Hedgehog-Signalgenen fehlen, ist es sehr wahrscheinlich, dass andere Signalwege existieren, die mit dem Hedgehog-Signalweg und dessen Genen interagieren können. Einige Autoren konnten hierzu bereits Beziehung zum MAPK- oder auch PI3K/Akt-Signalweg nachweisen, indem sie zeigten, dass diese Signalwege auch unabhängig von der Ptch-Smo-Gli-Achse zu einer Erhöhung von Gli1 in der Zelle führen können (Madhala-Levy et al., 2012; Liu et al., 2012; Riobo et al., 2006; Stecca et al., 2007). Insgesamt ist über den Bereich der Hedgehog-Signalweg-Interaktionen jedoch noch recht wenig bekannt und derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

### **1.2.5 Hedgehog-Signalweg-Inhibitoren**

Die deutlichen Hinweise auf eine Beteiligung des Hedgehog-Signalweges an der Tumorentstehung und das zunehmende Verständnis über die genauen intra- und extrazellulären Abläufe weckten in den letzten Jahren enormes Interesse an der Erforschung und Erstellung von Substanzen, die in der Lage sind, den Hedgehog-Signalweg zu unterdrücken.

Betrachtet man die Transduktion des Signalweges genauer (Abb. 6), könnten mehrere Schlüsselpositionen genutzt werden, um den Hedgehog-Signalweg zu blockieren. Folgt man dabei den Abläufen chronologisch, findet man die erste Interventionsmöglichkeit bei der Bindung des Hedgehog-Liganden an Ptch. Neben dem Hedgehog-Antikörper 5E1 ist hierbei mit Robotnikinin derzeit nur ein weiteres synthetisch hergestelltes Molekül bekannt, das als direkter Inhibitor des Hedgehog-Liganden wirkt (Stanton et al., 2009).

Die zweite Möglichkeit zur Inhibition bietet das Protein Smo. Es ist derzeit wohl das am besten und häufigsten untersuchte Molekül im Hedgehog-Signalweg für welches u.a. mit Cyclopamin, Vismodegib, IPI-929, LDE225 oder Cur-61414 auch die meisten Inhibitoren auf dem Markt sind (Stanton und Peng, 2010). Die vielversprechenden präklinischen Ergebnisse führten sogar soweit, dass Smo-Antagonisten, als erste und bislang einzige Gruppe der Hedgehog-Inhibitoren u.a. bei Medulloblastomen oder Basalzellkarzinomen, den Weg in klinische Studien fanden (Rudin et al., 2009; Von Hoff et al., 2009).

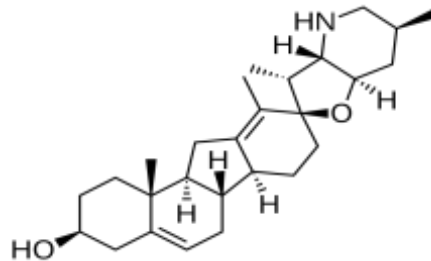
Den letzten Angriffspunkt für Hedgehog-Inhibitoren bietet der Transkriptionsfaktor Gli. Seine Aktivität lässt sich entweder indirekt über Hemmung des intraflagellären Transports des Smo-Proteins (HPI-1-4) oder direkt durch Störung der Bindung an den Promotor (GANT58, GANT61) unterdrücken (Hyman et al., 2009; Lauth et al., 2007). Die direkte Inhibition von Gli ist noch ein recht junges Forschungsgebiet, doch zeigten auch hier neuere präklinische Studien mit GANT61 für Tumore von Colon, Pankreas oder Leukämiezellen erste ansprechende Ergebnisse und somit Potential, auch diesen Zweig der Hedgehog-Inhibitoren zukünftig weiter in die Tumorforschung zu integrieren (Agyeman et al., 2012; Fu et al., 2013; Pan et al., 2012).

Da jedoch die bislang bedeutungsvollsten Ergebnisse für Hedgehog-Inhibition in den letzten Jahren aus der Gruppe der Smo-Antagonisten kamen und auch in der vorliegenden Arbeit zwei Smo-Inhibitoren verwendet werden, soll im Folgenden diese Gruppe anhand von Cyclopamin und Vismodegib näher betrachtet werden.

#### **1.2.5.1 Cyclopamin**

Cyclopamin gehört in die Gruppe der Alkaloide (Abb. 7) und zählt neben Jervin zu den ersten bekannten, natürlich vorkommenden Hedgehog-Inhibitoren. Entdeckt wurde die Substanz in den 1960er Jahren als Inhaltsstoff des Liliengewächses *Veratrum californicum*, nachdem man beobachtete, dass die Nachkommen von Schafen, die diese Pflanze verzehrt hatten, an Holoprosencephalie und Zyklopie litten (Binns et al., 1963; Keeler und Binns, 1968). Es gelang jedoch erst Jahrzehnte später, nach der Entdeckung des Hedgehog-Signalweges, den genauen Wirkmechanismus von Cyclopamin aufzudecken und seine Rolle als Smo-Inhibitor zu definieren (Cooper et al., 1998). Man konnte nachweisen, dass die direkte Interaktion von Cyclopamin mit Smo eine Konformationsänderung und damit Inaktivierung des Proteins bedingt, was letztlich zu einer Blockade des Hedgehog-Signalweges führt (Chen et al., 2002). Bei Untersuchungen von Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen konnte gezeigt werden, dass Cyclopamin in der Lage ist, die Effekte onkogener Mutationen in Smo und Ptch teilweise bis vollständig aufzuheben (Taipale et al., 2000). Trotz der vielversprechenden präklinischen *in vitro* und *in vivo* Versuche an unterschiedlichen Tumoren, konnte sich die Substanz aufgrund schlechter oraler Bioverfügbarkeit in klinischen Studien kaum etablieren (Tasch und Avci, 2004). Nach Herstellung von potenteren Cyclopamin-Derivaten mit besserer Bioverfüg-

barkeit verschwand die Substanz schließlich gänzlich aus der Klinik, stellt aber weiterhin die Referenzsubstanz für Hedgehog-Inhibitoren in präklinischen Studien dar (Lin und Matsui, 2012).

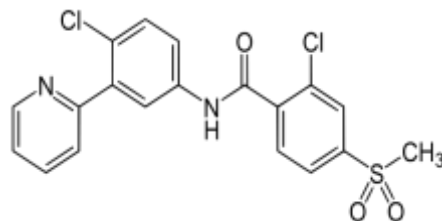


**Abb. 7: Strukturformel von Cyclopamin**

### 1.2.5.2 Vismodegib

Vismodegib, auch unter dem Namen GDC-0449 bekannt, ist ein synthetisch hergestellter Hedgehog-Inhibitor, der ebenfalls seine Wirkung als Smo-Antagonist ausübt, doch mit Cyclopamin keine strukturelle Verwandtschaft aufweist (Abb. 8) (Rudin, 2012). Mehrere vielsprechende, präklinische *in vivo* Versuche an Basalzellkarzinomen, Medulloblastomen oder Pankreastumoren, gepaart mit einer pharmakokinetischen Optimierung der Substanz, ebneten Vismodegib als ersten Hedgehog-Signalweg-Inhibitor den Weg in klinische Studien (De Smeale et al., 2010; Robarge et al., 2010; Romer et al., 2004). Rudin et al. (2009) und Von Hoff et al. (2009) konnten dabei die ersten positiven Ergebnisse einer Phase I Studie zur Behandlung von Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen mit Vismodegib aufweisen. Weitere Anstrengungen und nachfolgende Studien führten schließlich im Januar 2012 zur Zulassung von Vismodegib für fortgeschrittene und metastasierende Basalzellkarzinome durch die *U.S. Food and Drug Administration (FDA)*. Letztlich ausschlaggebend hierfür war eine Phase II Studie von Sekulic et al. (2012), die zeigte, dass von 96 Patienten mit Basalzellkarzinom über 43 % auf Vismodegib ansprachen und immerhin noch 30 % der Patienten mit einer fortgeschrittenen und metastasierten Krankheit von dieser Therapie profitierten. Angetrieben von diesen jüngsten Erfolgen mit Vismodegib sind derzeit über 62 weitere klinische Studien am Laufen, welche die Wirkung von Smo-Inhibitoren auf verschiedenste Tumortypen untersuchen (Sandhiya et al., 2013; U.S. National Institutes of Health, 2013). Die dabei für die

vorliegende Doktorarbeit wohl interessanteste ist eine laufende Phase I Studie von Huff (2011), welche die Wirkung von Vismodegib bei Patienten mit rezidivierendem Multiplen Myelom nach autologer Stammzelltherapie untersucht. Für diese Studie sind jedoch bislang noch keine Zwischenergebnisse veröffentlicht worden (Huff, 2011).



**Abb. 8: Strukturformel von Vismodegib**

### 1.2.6 Untersuchungen des Hedgehog-Signalwegs beim Multiplen Myelom

Die ersten Arbeiten, die sich mit der Beziehung zwischen Hedgehog-Signalweg und Multiplen Myelomzellen beschäftigen, wurde von Peacock et al. (2007) und Dierks et al. (2007) im Jahre 2007 veröffentlicht. Beide Arbeiten gelten als Vorreiter auf diesem Gebiet und zeigen verschiedene Ansätze und Aspekte auf, inwieweit der Hedgehog-Signalweg Entstehung, Wachstum und auch Erhalt von Myelomzellen beeinflusst (Dierks et al., 2007; Peacock et. al., 2007).

Die Ergebnisse von Peacock et al. (2007) gehen dabei von der Existenz der Tumorstammzelltheorie aus, die besagt, dass in jedem Tumor eine kleine Untergruppe von undifferenzierten Zellen besteht, die, mit Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotential ausgestattet, typische Eigenschaften von Stammzellen besitzen (Bonnet und Dick, 1997). Im Vergleich zur Masse der differenzierten Tumorzellen erweist sich diese Untergruppe deutlich resistenter gegenüber herkömmlicher Chemotherapie, so dass man die Tumorstammzelltheorie als Erklärung für Rezidive wie auch für die Entstehung von Metastasen heranziehen kann (Matsui et al., 2008). Rückblickend betrachtet stellte man eine funktionell heterogene Gruppe von Zellen bereits Ende der 1960er Jahre im Multiplen Myelom fest, doch verliehen erst Studien um die Jahrtausendwende diesen Zellen eine wichtige Bedeutung (Bergsagel und Valeriote, 1968). Nach der Tumorstammzelltheorie bestehen Myelomzellen aus wenigen (< 5%) entarteten CD19<sup>+</sup>/CD138<sup>-</sup>B-

Lymphozyten, die als „Stammzellen“ die Fähigkeit besitzen, sich zu erneuern und sukzessive in maligne CD19<sup>-</sup>/CD138<sup>+</sup>-Plasmazellen zu differenzieren (Matsui et al., 2004). Anhand dieses Konzepts und dem Wissen, dass gesunde Stammzellen in hohem Maße vom Hedgehog-Signalweg reguliert werden, vermuteten Peacock et al. (2007) auch im Multiplen Myelom eine erhöhte Hedgehog-Aktivität, welche die Entstehung und den Erhalt des Tumors beeinflusst (Ingham und McMahon, 2001). Verglichen mit gesunden Plasma- und B-Zellen, konnten sie eine vermehrte Expression von Hedgehog-Genen in Myelomzellen (untersucht wurden sowohl mehrere Myelomzelllinien, als auch Myelomzellen aus frischen Knochenmarksproben) nachweisen, wobei insbesondere eine signifikant erhöhte Hedgehog-Aktivität in der CD19<sup>+</sup>/CD138<sup>-</sup>-„Stammzellfraktion“ festgestellt wurde. Des Weiteren zeigten sie, dass eine ligandenabhängige Stimulation des Hedgehog-Signalweges das Selbsterneuerungspotential signifikant steigerte und diese Zellen zudem in einem undifferenzierten Zustand hielt. Behandlungen mit Hedgehog-Inhibitoren wie Cyclopamin führten dagegen zu einem Verlust der „Stammzellfraktion“ durch Hemmung des Selbsterneuerungspotentials und der gleichzeitigen Überführung undifferenzierter Zellen in maligne CD19<sup>-</sup>/CD138<sup>+</sup>-Plasmazellen (Peacock et al., 2007). Peacock et al. (2007) betonten jedoch in ihrer Arbeit, dass diese differenzierten Zellen – und damit der Hauptanteil der Myelomzellen, durch eine Intervention des Hedgehog-Signalweges nicht beeinflusst werden kann. Im Detail machten sie darauf aufmerksam, dass sie, anhand von konventionellen Messungen *in vitro*, bei der Behandlung mit Cyclopamin keinerlei Auswirkungen auf Zellwachstum, Lebensfähigkeit oder Apoptose nachweisen konnten (Peacock et al., 2007).

Zusammengefasst beschreibt dies demnach ein Modell, in welchem der Hedgehog-Signalweg eine vermehrungsfähige, undifferenzierte Zellgruppe im Multiplen Myelom aufrechterhält und Hedgehog-Inhibitoren nicht auf zytotoxischem Wege, sondern durch Induktion von Differenzierung, zu einer Reduktion dieser Zellgruppe führen.

Die Ergebnisse von Dierks et al. (2007) gehen dagegen von einem direkt parakrinen Stimulationsmodell im Multiplen Myelom aus, wobei die Stromazellen des Knochenmarks Faktoren produzieren, die das Wachstum von Myelomzellen beeinflussen. In ihrer Arbeit verwendeten sie ausschließlich Myelomzellen aus frischem Knochenmark (primäre Myelomzellen), die ohne das Beisein von Stromazellen nur kurzzeitig lebensfähig waren. Sie wiesen nach, dass neben anderen Wachstumsfaktoren (u.a. IL-6 und IL-7) auch

Hedgehog-Liganden in Stromazellen produziert werden und betonten ihre entscheidende Rolle für das Überleben des Tumors, sowohl bei *in vivo* Versuchen an Mäusen, als auch *in vitro* mit co-kultivierten Stromazellen. Anhand der zusätzlichen Behandlung mit Cyclopamin konnte gezeigt werden, dass Hedgehog-Inhibitoren in der Lage waren, Bcl-2 herunter zu regulieren und Apoptose in Myelomzellen zu induzieren (Dierks et al., 2007).

Zusammengefasst beschreiben Dierks et al. (2007) demnach ein Modell, in welchem Myelomzellen das Stroma des Knochenmark benötigen, um sich über den Hedgehog-Signalweg vor Apoptose zu schützen und Hedgehog-Inhibitoren in der Lage sind, durch Herunterregulation von Bcl2, Apoptose in Myelomzellen zu induzieren.

### **1.3 Ziele und Fragestellungen der Arbeit**

Von den scheinbar gegensätzlichen Aussagen von Dierks et al. (2007) und Peacock et al. (2007) motiviert und der Tatsache, dass Peacock et al. (2007) die genauen Daten dazu nicht veröffentlichten, versucht die vorliegende Doktorarbeit über eine eigene Versuchsreihe das Apoptoseausmaß bei der Behandlung von Multiplen Myelomzellen mit Hedgehog-Inhibitoren zu analysieren. Hierzu werden drei verschiedene Myelomzelllinien ausgewählt und jeweils mit Cyclopamin und Vismodegib behandelt. Nach Bestimmung des Apoptoseverhaltens sollen anschließend die vermeintlich widersprüchlichen Aussagen anhand der eigenen erhobenen Daten diskutiert und, wenn möglich, auch eine Erklärung des scheinbaren Widerspruchs geliefert werden.

Zusätzlich werden in dieser Arbeit Kombinationsbehandlung der Hedgehog-Inhibitoren mit drei weiteren therapeutischen Substanzen – Bortezomib, Lenalidomid, NVP-BEZ235 – durchgeführt. Diese verfolgen das Ziel, über eventuelle Änderungen des Apoptoseverhaltens, Interaktionen zwischen den Stoffen bzw. der betroffenen Signalwegen aufzudecken

Im Einzelnen soll die vorliegende Doktorarbeit insbesondere Antworten auf folgende Fragen geben:

1. Induzieren die Hedgehog-Inhibitoren Cyclopamin und Vismodegib Apoptose in Multiplen Myelomzellen in Abwesenheit von Stromazellen *in vitro*?



2. Ist das parakrin beschriebene Hedgehog-Modell das einzige, welches Myelomzellen benutzen, um sich vor Apoptose zu schützen?
3. Gibt es Unterschiede in den Ansprechraten zwischen Cyclopamin und Vismodegib?
4. Können die Hedgehog-Inhibitoren die Apoptoseraten anderer Apoptose induzierender Medikamente/Signalwege beeinflussen?
5. Könnte der Hedgehog-Signalweg als weiterer Signalweg betrachtet werden, der das Überleben von Myelomzellen mitbestimmt?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Produkt	Hersteller
Autoklav: Varioklav <sup>®</sup> Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH, Obeschleißheim
Cytomics FC 500 Series	Beckman Coulter, Krefeld
Lichtmikroskop: Olympus CKX 41	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Multi-Mode Mikroplatten Reader (Synergy <sup>™</sup> 2)	BioTek <sup>®</sup> , Bad Friedrichshall
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
QuadroMACS <sup>™</sup> Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Sicherheitswerkbank (HERAsafe)	Thermo scientific, Karlsruhe
VortexGenie2	Scientific Industrie, New York, USA
Wasserbad	Memmert GmbH+Co.KG, Schwabach
Zellkultur-Brutschrank (HERAcell240)	Thermo scientific, Karlsruhe
Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo scientific, Karlsruhe
Allegra <sup>®</sup> X-15 Centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Eppendorf-Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
6-Loch-Kulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,
96-Loch-Flachbodenplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,
96-Loch-V-Bodenplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,
Combitips	Eppendorf AG, Hamburg
FACS-Röhrchen	Beckman Coulter, Krefeld
Kryoröhrchen, 1 und 1,8 ml	Nalge Nunc, Wiesbaden
MACS <sup>®</sup> Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Oberflächen-Desinfiziens	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Peha-Soft-Handschuhe	Ansell Healthcare, Richmond, USA
Pipetten (10, 20, 100, 200 und 1000 µl) und Multistep Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten, gestopft (2, 5, 10, 25 und 50 ml)	Corning Incorporated, New York, USA
Pipettenspitzen	Greiner, Erlangen
Polypropylenröhrchen Falcon <sup>®</sup> (10 und 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäß/Microtube 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturflasche (75 cm <sup>2</sup> )	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Zellkulturflasche (Triple Flask)	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark

### 2.1.3 Zelllinien

Name	Ursprung
AMO1	DSMZ-Nr. ACC-538, Plasmozytom; Zellen entnommen aus Aszites einer 64jährigen Patientin mit Plasmozytom (IgAkappa) des Zwölffingerdarms zwei Monate nach Resektion der Tumormasse im Jahre 1984
KMS11	JCRB-Nr. 1179, Multiples Myelom; Zellen entnommen aus IgG-infiltrierter Pleuraeffusion einer 67jährigen Patientin im Jahre 2006
U266	DSMZ-Nr. ACC-9, Multiples Myelom; Zellen entnommen aus peripheren Blut eines 53jährigen Patienten mit refraktärem IgE-sezernierendem Myelom im Jahre 1968
Native CD19 <sup>+</sup> -B-Lymphozyten	freiwilliger Spender

### 2.1.4 Reagenzien

Produkt	Hersteller
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bortezomib	Millenium Pharmaceuticals Limited, Cambridge, USA

Cyclopamin	LC Laboratories, Woburn, USA
DEVD-AMC	Alexis Biochemicals, Grünberg
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
Lenalidomid	Selleck Chemicals, Houston, USA
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
NVP-BEZ235	Novartis Deutschland GmbH, Nürnberg
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
SDS	Roth, Karlsruhe
Staurosporin	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
TritonX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin-EDTA 0,05 %	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Vismodegib (GDC-0449)	Selleck Chemicals, Houston, USA
X-VIVO™ <sub>20</sub> Medium	BioWhittaker, Verviers, Belgien
zVAD-FMK	Bachem Distribution Services GmbH, Weil am Rhein

---

### 2.1.5 Kits

Produkt	Hersteller
BCA <sup>TM</sup> -Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Ficoll-Paque Plus	Amersham Biosciences, Freiburg

### 2.1.6 Medien und Antibiotika

Produkt	Hersteller
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen Gibco <sup>TM</sup> , Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (PenStrep <sup>®</sup> )	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Plasmocin	InvivoGen, San Diego, USA
RPMI 1640 + GlutaMAX <sup>TM</sup>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 2.1.7 Puffer und Lösungen

Produkt	Zusammensetzung
2xRx-Mix	100 mM HEPES, 200 mM NaCl, 20 % Sucrose, 0,2 % CHAPS 4 mM CaCl <sub>2</sub>
Gebrauchslösung für Apoptose-aktivitätsmessung (Rx-Mix)	2xRx-Mix, 13 mM DTT, 70 µM DEVD-AMC in H <sub>2</sub> O (1:1)
MACS <sup>®</sup> -Puffer	0,5 % BSA, 2 mM EDTA in PBS (pH 7,2)

Reagenz A	0,886 % Bicinchoninsäure, 0,16 % Na <sub>2</sub> -Tartrat, 2 % Natriumcarbonat (wasserfrei), 0,95 % Natriumhydrogencarbonat, pH 11,2
Reagenz B	4 % Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat
RIPA-Puffer	1 % Igepal CA-630, 0,5 % Na-Deoxycholat, 0,1 % SDS, 2 mM EDTA
RIPA-Lysepuffer	2 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF, 1 mM Na-Orthovanadat in 1 ml RIPA
Propidiumiodid-Lösung für Apoptosemessung nach Nicolleti	0,1 % TritonX, 0,1 % Na-Citrat, 0,05 mg/ml PI
Bortezomib-Stocklösung	1 mg/ml gelöst in NaCl 0,9 %
Cyclopamin-Stocklösung	10 mM gelöst in Ethanol
Lenalidomid-Stocklösung	10 mM gelöst in DMSO
NVP-BEZ235-Stocklösung	1 mM gelöst in DMSO
Staurosporin-Stocklösung	2 mM gelöst in DMSO
zVAD- Stocklösung	20 mM gelöst in EtOH/DMSO
Vismodegib-Stocklösung	50 mM gelöst in DMSO

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Zelllinien

Um den Einfluss der Hedgehog-Inhibitoren Cyclopamin und Vismodegib (GDC-0449) auf das Apoptoseverhalten von Multiplen Myelomzellen zu untersuchen, wurden die drei Myelomzelllinien AMO1, KMS11 und U266 verwendet. Es erfolgte die Kultivierung aller Zelllinien bei 37 °C unter einer Atmosphäre von 4 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche in folgendem Medium:

RPMI 1640+GlutaMAX<sup>TM</sup>-I + 10 % FCS + PenStrep (5000 U/ml Penicillin, 5000 µg/ml Streptomycin) + 5 µg/ml Plasmocin

Um jeder Zelllinie eine optimale Voraussetzung zu Wachstum und Vermehrung zu ermöglichen, beobachtete man die Entwicklung der Zellen täglich unter dem Lichtmikroskop. Die Zellen erhielten jede Woche mehrmals frisches Medium in Form eines Mediumwechsels und wurden bei ausreichender Vermehrung in kleinere Zellkolonien gesplittet, um stets die einheitlichen Voraussetzungen für Wachstum und Vermehrung zu gewährleisten. Für das Zellsplitting wurden die Zellen bei 524 g (1500 rpm) 5 Minuten (min) lang bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, das alte Medium als Überstand verworfen und eine kleinere Anzahl an Zellen in neuem frischen Medium aufgenommen.

#### 2.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zelllösung und 10 µl Trypanblau gemischt und die Suspension mittels Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Da Trypanblau nur die Zellmembran toter Zellen durchdringt und gesunde Zellen nicht anfärbt, wurde auf diese Weise die Zahl der lebenden Zellen ermittelt und anhand folgender Formel errechnet:

Errechnete Zellzahl = Lebendzellzahl / 4 x Verdünnungsfaktor x Zählkammerfaktor 10<sup>4</sup>



### **2.2.1.3 Einfrieren von Zellen**

Um zu jeder Zeit alle Zelllinien schnell verfügbar zu haben, wurden im Laufe der Arbeit aus allen gehaltenen Kulturen Zellen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  weggefroren. Die Anzahl der einzufrierenden Zellen wurde bei Suspensionszellen (AMO1) auf ca.  $5 \times 10^6$  und bei Adhärenzzellen (KMS11, U266) auf etwa  $1 \times 10^6$  festgelegt und mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Die dieser Zellzahl entsprechende Menge an Medium wurde der Kultur entnommen, bei 524 g 5 min lang bei RT zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das zurückbleibende Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium (800  $\mu\text{l}$  FCS + 80  $\mu\text{l}$  DMSO) resuspendiert und die Zellsuspension in einem Kryoröhrchen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  weggefroren.

### **2.2.2 Isolierung von nativen B-Lymphozyten**

Zur Isolierung von nativen B-Lymphozyten aus heparinisiertem Blut von einem gesunden freiwilligem Spender bediente man sich den Techniken der Ficoll-Gradientenzentrifugation, der X-VIVO 20-Adhäsion und der magnetischen Zellseparation (MACS<sup>®</sup>).

#### **2.2.2.1 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation**

Die Ficoll-Methode ist ein physikalisches Trennverfahren, bei der die zu untersuchende Probe über eine Ficoll-Polysacharrose-Lösung (Ficoll-Paque) mit einer Dichte von 1,077 g/ml geschichtet wird und durch Zentrifugieren die einzelnen Bestandteile anhand eines Dichtegradienten aufgetrennt werden (Bøyum, 1976).

Unter der Sterilbank wurden 50 ml des Spenderblutes mit PBS verdünnt und auf 180 ml aufgefüllt. Jeweils 30 ml dieses Blut/PBS-Gemisches wurden über 12 ml der Ficoll-Lösung geschichtet. Im Anschluss an eine 20minütige Zentrifugation bei 755g (1800 rpm) und RT ohne Bremse wurde der sich gebildete Leukozytenring oberhalb der Ficoll-Lösung, aufgrund seiner Dichte hauptsächlich bestehend aus mononukleären Zellen (Monozyten und Lymphozyten), abgesaugt und in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt. Hier erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang mit Resuspension in 50 ml PBS und 5minütiger Zentrifugation bei 524 g und RT mit Bremse. Nach Abkippung des Über-

standes wurde das Zellpellet in X-VIVO 20 Medium aufgenommen und die Gesamtzellzahl mittels Neubauerzählkammer ermittelt.

### **2.2.2.2 X-VIVO 20-Adhäsion**

Zur weiteren Isolierung wurden  $1 \times 10^8$  der gezählten Zellen in einer Gewebekulturflasche mit 10 ml X-VIVO 20 Medium gelöst und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Durch die Fähigkeit zur Adhärenz der Monozyten am Plastik der Zellkulturflasche verblieb die Lymphozytenfraktion isoliert im Überstand. Nach Absaugung und dreimaliger Waschung der Kulturflasche mit jeweils 10 ml PBS wurde dieser in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 524 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Zellpellet in Kulturmedium gelöst und die Zellzahl des Lymphozytengemisches per Neubauerzählkammer bestimmt.

### **2.2.2.3 Magnetische Zellseparation (MACS<sup>®</sup>)**

Mittels magnetischer Zellseparation (MACS<sup>®</sup>), einem Trennverfahren, welches eine Kölner Arbeitsgruppe Anfang der 1990er Jahre entwickelte, wurden im nächsten Schritt reine B-Lymphozyten anhand des Oberflächenmarkers CD19 aus dem Lymphozytengemisch separiert (Miltenyi et al., 1990). Beim MACS<sup>®</sup>-Verfahren wird eine bestimmte Oberflächenstruktur der Zielzellen von Antikörpern, welche ihrerseits an MicoBeads (kleine magnetische Kügelchen) gebunden sind, markiert. Im Anschluss werden die Zellen in eine sich in einem Magnetfeld befindende Trennsäule überführt. Während die nicht markierten Zellen die Trennsäule passieren, bleiben die markierten Zielzellen in der Trennsäule haften und sind so für weitere Untersuchungen zugänglich.

Zur Separierung wurde das im Kulturmedium gelöste Lymphozytengemisch zunächst bei 300g (1135 rpm) für 10 min bei RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend das Zellpellet in kaltem MACS<sup>®</sup>-Puffer und einer CD19-MicroBeads-Lösung resuspendiert. Nach 15minütiger Inkubation bei 4 °C, wurden die Zellen mit MACS<sup>®</sup>-Puffer gewaschen, bei 300g für 10 min bei RT zentrifugiert und nach Abkippen des Überstandes das Zellpellet erneut in MACS<sup>®</sup>-Puffer gelöst. Anschließend wurde der MACS<sup>®</sup>-Separators vorbereitet, die LS+-Trennsäule in ein Magnetfeld gebracht und mit der Zelllösung beladen. Während die nicht markierten Zellen im Durchfluss verworfen

werden konnten, wurden die CD19 markierten B-Lymphozyten in der LS+-Trennsäule festgehalten. Durch Entfernung der LS+-Trennsäule vom Magneten, konnten im Folgenden die reinen CD19<sup>+</sup>-Zellen mit MACS<sup>®</sup>-Puffer in ein 50 ml Falcon eluiert werden.

### **2.2.3 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, welches es ermöglicht, auf einfache und schnelle Weise, Morphologie und Eigenschaften einzelner Zellen aus großen oder kleinen Zellzahlen zu bestimmen. Die Grundlagentechnologie wurde bereits 1968 von Wolfgang Ghöde an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster entwickelt und in den folgenden Jahrzehnten stetig verbessert und modernisiert. Sie ist heute aus der Klinik als Routinediagnostik in der Hämatologie, Infektiologie und Immunologie nicht mehr wegzudenken (Khmel, 2009).

Das Prinzip des Verfahrens beruht auf einem Laser, welcher die nacheinander in eine Messküvette gesogenen Zellen einzeln bestrahlt. Beim Aufeinandertreffen von Laser und Zelle treten zwei Ereignisse auf, welche sich anhand moderner Computertechnologie objektivieren lassen.

Zum einen wird der Laserstrahl beim Treffen auf die Zelle in verschiedene Richtungen gestreut, wobei dieses Ereignis Informationen über die morphologischen Eigenschaften einer Zelle darstellt. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter), welches in einem flachen Winkel von Detektoren zwischen 0° und 10° gemessen wird, korreliert dabei mit der Größe und dem Volumen einer Zelle, während das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter), im 90° Winkel gemessen, Informationen über die Granularität einer Zelle liefert. Das zweite Ereignis stellt die antigenen Eigenschaften einer Zelle in den Vordergrund, welche anhand von Fluoreszenzfarbstoffen gemessen werden. Hierbei werden zunächst die zu untersuchenden Merkmale einer Zelle von einem Antikörper markiert, welcher seinerseits an einer fluoreszierenden Gruppe gebunden hat. Trifft nun der Laser auf eine fluoreszenzmarkierte Zelle, wird dieser angeregt und sendet Lichtstrahlen einer bestimmten Wellenlänge aus, die von einem Detektor des Durchflusszytometers erfasst wird. Wichtig hierbei ist, dass es verschiedene Farbstoffe gibt, die jeweils nur von einem passenden Laser mit bestimmter Wellenlänge angeregt werden können, und dass die angeregten Farbstoffe ihrerseits Lichtstrahlen mit unterschiedlich großen Wellenlängen

aussenden, die von verschiedenen Detektoren erfasst werden müssen. Daher sind die modernen Durchflusszytometer mittlerweile mit mindestens zwei verschiedenen Lasern ausgestattet und verfügen über mehrere mit Filtern ausgestattete Fluoreszenzkanäle (FL), die Fluoreszenzen mit unterschiedlichen Wellenlängen detektieren.

Das im Rahmen dieser Arbeit für die Apoptosemessung verwendete Durchflusszytometer „FC 500 Series“ von der Firma Beckman Coulter verfügt über zwei Laser, wobei der einfache 488 nm-Argon-Laser für die Anregung der PI gefärbten Zellen zum Einsatz kam. Mit fünf Fluoreszenzkanälen (FL1-FL5) ausgestattet ist das Gerät in der Lage, Wellenlängen von 185-900 nm zu detektieren, wobei PI mit einem Emissionsmaximum von 590 nm auf Kanal 3 (FL3) gemessen wurde.

Die Auswertung für die in 2.2.5 beschriebenen Versuche erfolgte nach der Methode von Nicolletti et al., (1991) und wurde durch die CXP-Software der Firma Beckman Coulter graphisch dargestellt. In den erstellten Histogrammen wurden die Zellzahlen gegen die Propidiumiodid-markierte DNA-Menge einer Zelle aufgetragen. Dabei stellten sich für gesunde Zellen zwei *Peaks* dar, welche jeweils dem DNA-Gehalt der Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt des Zellzyklus entsprachen. Der erste *Peak* mit weniger DNA zeigte die postmitotischen diploiden Zellen in der G1/G0-Phase, während der zweite *Peak* mit mehr DNA die postreplikativen Zellen in der G2/M-Phase widerspiegelte. Dazwischen stellten sich diejenigen Zellen mit intermediärem DNA-Gehalt dar, welche gerade die S-Phase des Zellzyklus durchliefen. Ausschlaggebend zur Apoptosemessung war jedoch der Sub-G1-Bereich im Histogramm, welcher apoptotische Zellen mit Kernfragmentation, Kondensation des Chromatins und somit geringerem DNA-Gehalt darstellte. Folglich wurde zur Bestimmung der Kernfragmentation die Zellzahl im Sub-G1-Bereich herangezogen, welcher den DNA-Gehalt hypodiploider Kerne von apoptotischen Zellen widerspiegelte.

#### **2.2.4 Propidiumiodid (PI) – Färbung**

Propidiumiodid (PI) ist ein roter Farbstoff, der mit der DNA interkaliert. Er hat die Eigenschaft zwischen Basenpaaren zu binden. Da PI nicht die Fähigkeit besitzt intakte Zellmembranen von lebenden Zellen zu permeieren und daher nur tote Zellen mit perforier-

ten Membranen anfärbt, ist die PI-Färbung ein gängiges Verfahren zur Diskriminierung der Zellviabilität. Darüber hinaus ist PI in der Lage durch die Emission von Licht (Fluoreszenz) Informationen über den DNA-Gehalt einer Zelle zu geben, was eine Unterteilung zwischen vitalen oder apoptotischen Zellen ermöglicht. Die Möglichkeit der Unterteilung beruht darauf, dass verglichen mit vitalen Zellkernen, der fragmentierte DNA-Gehalt apoptotischer Zellen nur geringere Mengen von PI bindet, was durchflusszytometrisch anhand schwächerer Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden kann (Nicoletti et al., 1991). Dabei verwendete man eine spezielle Propidiumiodid-Lösung u.a. mit dem Zusatz TritonX, welches die Fähigkeit besitzt Zellmembranen für andere Stoffe permeabel zu machen (Jamur und Oliver, 2010).

### **2.2.5 Untersuchung des Apoptoseverhaltens von Multiplen Myelomzellen**

Um die Kernfragmentation von Multiplen Myelomzellen unter dem Einfluss der Hedgehog-Inhibitoren Cyclopamin und Vismodegib zu untersuchen, wurden verschiedene Ansätze gewählt, in denen die Zelllinien AMO1, KMS11 und U266 mit unterschiedlicher Konzentration der Hedgehog-Inhibitoren und mit dem Caspase-Inhibitor zVAD behandelt wurden. Die unter 2.2.2 durch Ficoll- und MACS<sup>®</sup>-Verfahren isolierten CD19<sup>+</sup>-B-Lymphozyten dienten dabei als Kontrolle für den Einfluss auf gesunde Zellen.

Darüber hinaus wurde der prozentuale Anteil fragmentierter Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit Hedgehog-Inhibitoren und einer weiteren therapeutischen Substanz (Bortezomib, Lenalidomid, NVP-BEZ235) untersucht. Das Ausmaß der Kernfragmentation in den unterschiedlichen Ansätzen wurde jeweils nach Propidiumiodid (PI)-Färbung im Durchflusszytometer gemessen.

Des Weiteren dienten die Ansätze zur Erstellung von Gesamtzellproteinlysaten, welche es ermöglichten, mittels Fluoreszenz die Caspase 3-Aktivität der Zellen nach Behandlung mit Hedgehog-Inhibitoren zu bestimmen, um somit weitere Rückschlüsse auf das Apoptoseverhalten von Multiplen Myelomzellen zu erhalten.

#### **2.2.5.1 Behandlung von Multiplen Myelomzellen mit Cyclopamin/Vismodegib**

Für die einzelnen Zelllinien AMO1, KMS11 und U266 erstellte man jeweils getrennte Ansätze für Cyclopamin oder Vismodegib in 6-Loch-Platten. Es wurde die Apoptose-

Induktion bei den Cyclopamin-Konzentrationen 5, 10 und 20  $\mu\text{M}$  sowie bei den Vismodegib-Konzentrationen 10, 20 und 40  $\mu\text{M}$  untersucht. Um die Caspase-vermittelte Apoptose-Induktion eindeutig verifizieren zu können, wurden parallel Ansätze mit Cyclopamin bzw. Vismodegib in Kombination mit dem pan-Caspase-Inhibitor zVad durchgeführt. Jeder Ansatz, bestehend aus neun Kavitäten, enthielt neben zVAD eine Negativkontrolle mit Ethanol/DMSO und eine Positivkontrolle mit Staurosporin. Pro Kavität wurden in 10 ml Nährmedium jeweils  $1,7 \times 10^6$  Zellen für die AMO1-Ansätze,  $1,5 \times 10^6$  Zellen für die KMS11-Ansätze und  $2 \times 10^6$  Zellen für die U266-Ansätze verwendet. Die mit zVAD zu behandelnden Zellen wurden eine Stunde mit dem pan-Caspaseinhibitor bei 37 °C vorinkubiert und anschließend mit Cyclopamin bzw. Vismodegib behandelt. Die Ansätze wurden für 48 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, im Anschluss die Zellen geerntet, mit PI gefärbt und mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert.

Das genaue Arbeits-/Pipettierschema ist im folgendem für Cyclopamin und Vismodegib getrennt dargestellt:

#### Cyclopamin-Ansatz für AMO1, KMS11 und U266

Kavität 1: 45  $\mu\text{l}$  Ethanol + 25  $\mu\text{l}$  DMSO

Kavität 2: 2,5  $\mu\text{l}$  Staurosporin

Kavität 3: 50  $\mu\text{l}$  zVAD

Kavität 4: 50  $\mu\text{l}$  zVAD + 5  $\mu\text{l}$  Cyclopamin

Kavität 5: 50  $\mu\text{l}$  zVAD + 10  $\mu\text{l}$  Cyclopamin

Kavität 6: 50  $\mu\text{l}$  zVAD + 20  $\mu\text{l}$  Cyclopamin

Kavität 7: 5  $\mu\text{l}$  Cyclopamin

Kavität 8: 10  $\mu\text{l}$  Cyclopamin

Kavität 9: 20  $\mu\text{l}$  Cyclopamin

### Vismodegib-Ansatz für AMO1, KMS11 und U266

Kavität 1: 25 µl Ethanol + 33 µl DMSO

Kavität 2: 2,5 µl Staurosporin

Kavität 3: 50 µl zVAD

Kavität 4: 50 µl zVAD + 2 µl Vismodegib

Kavität 5: 50 µl zVAD + 4 µl Vismodegib

Kavität 6: 50 µl zVAD + 8 µl Vismodegib

Kavität 7: 2 µl Vismodegib

Kavität 8: 4 µl Vismodegib

Kavität 9: 8 µl Vismodegib

### **2.2.5.2 Behandlung von nativen CD19<sup>+</sup>-B-Lymphozyten mit Cyclopamin/Vismodegib**

Für Cyclopamin und Vismodegib wurden die gleichen Konzentrationen wie unter 2.2.5.1 beschrieben gewählt und ein gemeinsamer Ansatz auf 6-Loch-Platten erstellt. Dieser bestand aus acht Kavitäten mit je  $1,7 \times 10^6$  Zellen in 10 ml RPMI. Als Negativkontrollen dienten Ethanol bzw. DMSO. Der Ansatz wurde für 48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, dann die Zellen geerntet und mit PI gefärbt. Im Anschluss wurde die Kernfragmentation durchflusszytometrisch bestimmt. Das Arbeits-/Pipettierschema ist im folgendem dargestellt:

### Cyclopamin/Vismodegib-Ansatz von CD19<sup>+</sup>-B-Lymphozyten

Kavität 1: 20 µl Ethanol

Kavität 2: 5 µl Cyclopamin

Kavität 3: 10 µl Cyclopamin

Kavität 4: 20 µl Cyclopamin

Kavität 5: 8 µl DMSO

Kavität 6: 2 µl Vismodegib

Kavität 7: 4 µl Vismodegib

Kavität 8: 8 µl Vismodegib

### **2.2.5.3 Behandlung von Multiplen Myelomzellen mit Cyclopamin/Vismodegib und weiteren therapeutischen Substanzen**

Als weitere Substanzen wurden der Proteasominhibitor Bortezomib mit physiologischer Konzentration von 1 ng/ml und 2 ng/ml, der Immunmodulator Lenalidomid mit 2 µM und 5 µM und der duale PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235 mit 250 nM und 500 nM untersucht. Als Referenz wurde für Cyclopamin eine 10 µM Konzentration und für Vismodegib eine 20 µM Konzentration gewählt. Es wurden verschiedenen Ansätze erstellt, bestehend aus sechs Kavitäten, wobei für die jeweiligen Zelllinien die in 2.2.5.1 beschriebenen Zellzahlen verwendet und in jeweils 10 ml Nährmedium gesät wurden. Die Ansätze wurden für 48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, dann die Zellen geerntet, mit PI gefärbt und die Kernfragmentation mittels des Durchflusszytometers bestimmt. Das Arbeits-/Pipettierschema ist im folgendem dargestellt:

#### Cyclopamin-Ansatz mit Bortezomib für AMO1, KMS11 und U266

Kavität 1: 10 µl Ethanol + 2 µl NaCl 0,9 %

Kavität 2: 10 µl Cyclopamin

Kavität 3: 1 µl Bortezomib

Kavität 4: 10 µl Cyclopamin + 1 µl Bortezomib

Kavität 5: 2 µl Bortezomib

Kavität 6: 10 µl Cyclopamin + 2 µl Bortezomib

#### Cyclopamin-Ansatz mit Lenalidomid für AMO1, KMS11 und U266

Kavität 1: 10 µl Ethanol + 5 µl DMSO

Kavität 2: 10 µl Cyclopamin

Kavität 3: 2 µl Lenalidomid

Kavität 4: 10 µl Cyclopamin + 2 µl Lenalidomid

Kavität 5: 5 µl Lenalidomid

Kavität 6: 10 µl Cyclopamin + 5 µl Lenalidomid



Cyclopamin-Ansatz mit NVP-BEZ235 für AMO1, KMS11 und U266

Kavität 1: 10 µl Ethanol + 5 µl DMSO

Kavität 2: 10 µl Cyclopamin

Kavität 3: 2,5 µl BEZ235

Kavität 4: 10 µl Cyclopamin + 2,5 µl BEZ235

Kavität 5: 5 µl BEZ235

Kavität 6: 10 µl Cyclopamin + 5 µl BEZ235

Vismodegib-Ansatz mit Bortezomib für AMO1

Kavität 1: 4 µl DMSO + 2 µl NaCl 0,9 %

Kavität 2: 4 µl Vismodegib

Kavität 3: 1 µl Bortezomib

Kavität 4: 4 µl Vismodegib + 1 µl Bortezomib

Kavität 5: 2 µl Bortezomib

Kavität 6: 4 µl Vismodegib + 2 µl Bortezomib

Vismodegib-Ansatz mit Lenalidomid für AMO1

Kavität 1: 9 µl DMSO

Kavität 2: 4 µl Vismodegib

Kavität 3: 2 µl Lenalidomid

Kavität 4: 4 µl Vismodegib + 2 µl Lenalidomid

Kavität 5: 5 µl Lenalidomid

Kavität 6: 4 µl Vismodegib + 5 µl Lenalidomid

### Vismodegib-Ansatz mit NVP-BEZ235 für AMO1

Kavität 1: 9 µl DMSO

Kavität 2: 4 µl Vismodegib

Kavität 3: 2,5 µl BEZ235

Kavität 4: 4 µl Vismodegib + 2,5 µl BEZ235

Kavität 5: 5 µl BEZ235

Kavität 6: 4 µl Vismodegib + 5 µl BEZ235

Nach Inkubation der Ansätze bei 37 °C für 48 h mit den jeweils vorgegebenen Substanzen, wurden die Zellen aus den Kavitäten geerntet und bei 524 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets in jeweils 2 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Für die Bestimmung der Rate hypodiploider Kerne im Durchflusszytometer wurden jeweils mindestens  $2 \times 10^5$  Zellen benötigt. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellpellets mit 300 µl PI-Lösung in FACS-Röhrchen resuspendiert und die Kernfragmentation im Durchflusszytometer bestimmt.

#### **2.2.6 Herstellung von Gesamtzellproteinlysaten**

Zur Herstellung von Gesamtzellproteinlysaten wurden die behandelten Zellen zur restlichen Entfernung des Nährmediums mit 1 ml PBS gewaschen und in Eppendorfer Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation der Zelllösung mit 524 g bei RT für 5 min verwarf man den Überstand und löste das Pellet in RIPA-Lysepuffer. Im Anschluss wurde die Zellsuspension für 20 min bei zwischenzeitlichen Vortexen auf Eis inkubiert. Danach wurden die unlöslichen Bestandteile bei 14000 rpm und 4 °C für mindestens 30 min abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in Kryoröhrchen überführt. Nach Entnahme eines 5 µl Aliquot für die Proteinkonzentrationsbestimmung lagerte man das restliche Lysat bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

### 2.2.7 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendete man Bicinchoninsäure (BCA), welche über eine zweischrittige Farbreaktion die Messung des Proteingehalts in einer Lösung ermöglicht (Smith et al., 1985). Im ersten Schritt führen die Peptidbindungen der Proteine zu einer Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen, welche anschließend in einer zweiten Reaktion mit BCA einen farbigen Komplex bilden. Dieser violette Komplex absorbiert Licht der Wellenlänge 562 nm linear zur Höhe des Proteingehaltes, sodass mittels ELISA-Messgerät über das Absorptionsverhalten die Proteinkonzentration bestimmt werden kann.

Die unter 2.2.6 entnommenen 5  $\mu\text{l}$  Aliquots der Gesamtzellproteinlysate wurden mit 20  $\mu\text{l}$  RIPA-Lysepuffer im Verhältnis 1:5 verdünnt und jeweils 10  $\mu\text{l}$  in Doppelbestimmung in einer 96-Loch-Flachbodenplatte gegen sechs BSA-Standardproteinlösungen und einer Negativkontrolle mit RIPA-Puffer aufgetragen. Nach Ansetzen der BCA-Reagenz durch Mischung der Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 50:1 wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  des BCA-Gemisches den Kavitäten hinzugefügt und der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anhand der Standardproteinlösungen wurde mittels des im Synergy™ 2 integrierten ELISA-Readers der Firma BioTek® eine Eichgrade erstellt, mit deren Hilfe bei einer Absorption von 562 nm die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte.

### 2.2.8 Caspase 3-Aktivitätsuntersuchung

Der Caspase 3-Aktivitätsuntersuchung ist eine Methode, um den Vorgang der Apoptose in einer Zelle nachzuweisen. Dieses Verfahren beruht auf der Tatsache, dass die beim Apoptosevorgang aktivierten Caspasen, insbesondere die Caspase 3, spezielle Aminosäuresequenzen innerhalb von Proteinen und Enzymen spalten, um den programmierten Zelltod einzuleiten. Nach Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes (Aminomethylcumarin (AMC)) – gebunden an eine Aminosäuresequenz (DEVD) – ist die aktivierte Caspase 3 in der Lage, die DEVD-Sequenz zu spalten und AMC freizusetzen. Durch fluorimetrische Messung im ELISA-Synergy™ 2 kann die Caspase 3-Aktivität anhand des freigesetzten Farbstoffes AMC gemessen werden.

Zur Durchführung wurden 20  $\mu\text{g}$  des Gesamtzellproteinlysates auf 50  $\mu\text{l}$  mit RIPA-Puffer verdünnt und in Dreifachbestimmung in eine 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert. An-

schließlich wurde jede Kavität mit 150 µl Rx-mix-Puffer, der 70 µM des DEVD-AMC Substrates enthielt, auf 200 µl aufgefüllt. Das freigesetzte AMC wurde mittels ELISA-Reader in einer zweistündigen Kinetik bei einer Exzitation von 360 nm und einer Emission von 460 nm gemessen.

### **2.2.9 Statistik**

In den Abbildungen des Ergebnisteils werden die Mittelwerte mit den Standardabweichungen gezeigt. Die deskriptive Statistik wurde mittels Microsoft Excel ausgewertet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test berechnet.  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. \* ( $P < 0,05$ ); \*\* ( $P < 0,01$ )

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Auswertung der Ansätze zum Apoptoseverhalten von Myelomzelllinien**

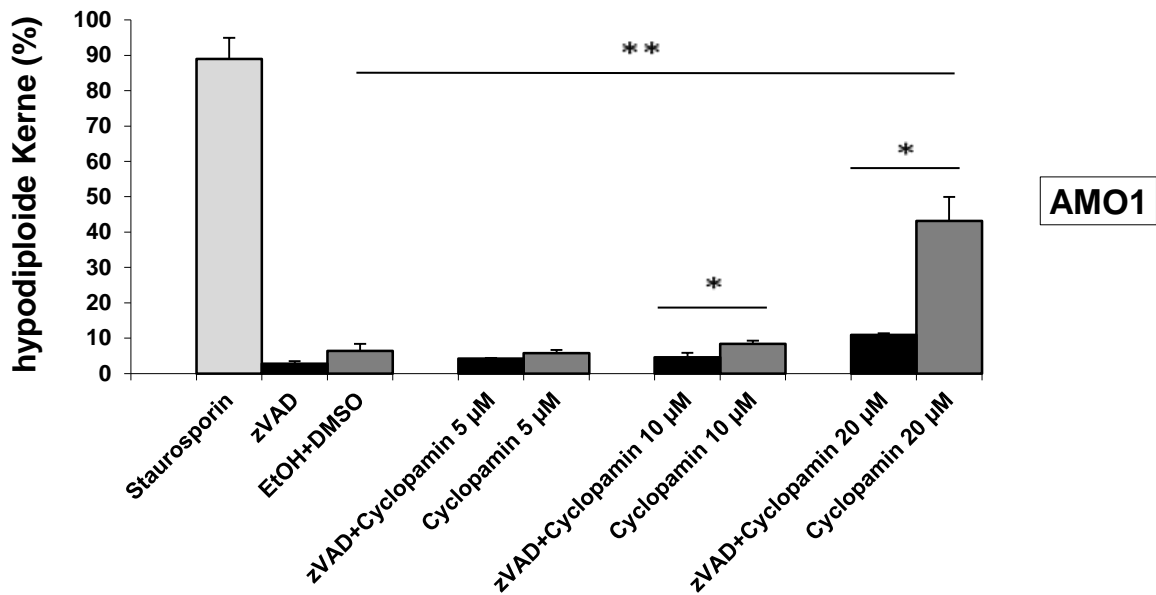
Zur Auswertung der Versuche wurden aus den durch die PI-Messung erstellten Histogramme die Kernfragmentation der einzelnen Zellansätze nach dem Nicolleti-Verfahren bestimmt und als Säulendiagramme graphisch dargestellt. Dabei wurden die Ansätze für die verschiedenen Myelomzelllinien, wie unter 2.2.5 beschrieben, gewählt, um einerseits eine konzentrationsabhängige apoptotische Wirkung der Hedgehog-Inhibitoren nachzuweisen und andererseits die Möglichkeit zu bieten, die Wirkung zweier verschiedener Hedgehog-Inhibitoren auf Multiple Myelomzellen zu vergleichen.

##### **3.1.1 Behandlung von AMO1 mit Cyclopamin/Vismodegib**

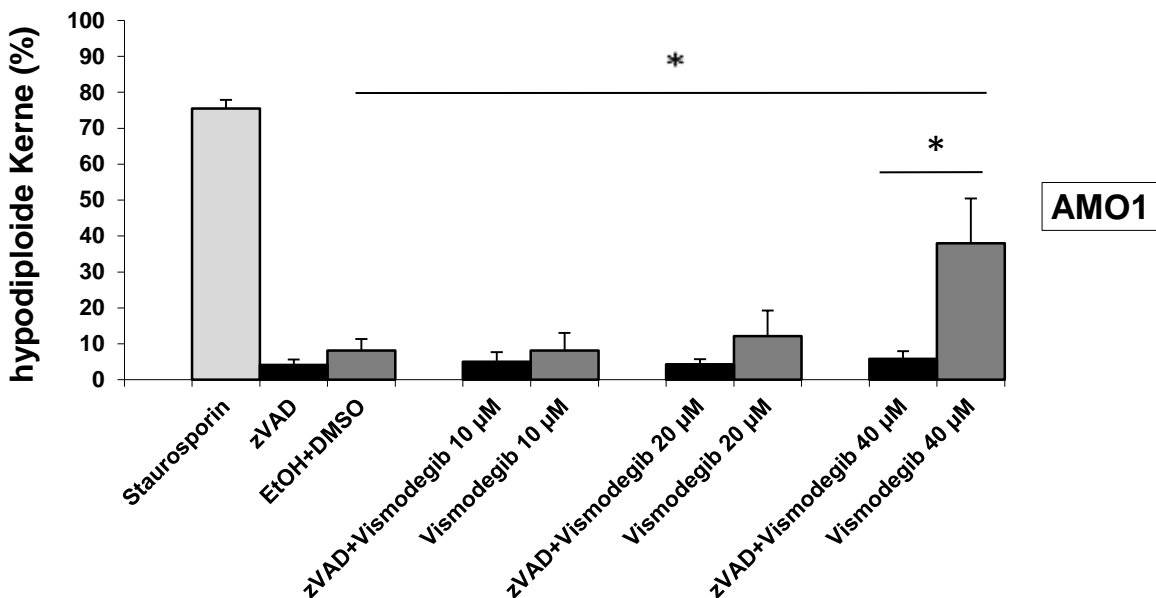
AMO1-Zellen wiesen nach einer 48 h Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  Cyclopamin eine signifikante Steigerung der Rate hypodiploider Kerne (Kernfragmentation) von über 43 % auf. Während sich bei kleineren Konzentrationen mit 10  $\mu\text{M}$  noch eine leichte Tendenz zur Apoptose andeutete, konnte für 5  $\mu\text{M}$  kein Apoptose-Effekt mehr gezeigt werden.

Auch nach der 48 h Behandlung mit Vismodegib führte die mittlere Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  zu einer Rate hypodiploider Kerne von 12 %, welche sich bei gewählter Höchstkonzentration von 40  $\mu\text{M}$  signifikant auf über 38 % steigern ließ. Die niedrigste gewählte Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Vismodegib zeigte dagegen keine apoptotische Wirkung.

Durch die Zugabe des Caspase-Inhibitors zVad, welcher als Kontrolle für die Apoptose-induktion gewählt wurde, beobachtete man für alle Konzentrationen, sowohl bei Cyclopamin als auch bei Vismodegib, ein Rückgang der Kernfragmentation. Insbesondere für die hohe Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  Cyclopamin und 40  $\mu\text{M}$  Vismodegib ließen sich die Raten hypodiploider Kerne signifikant auf unter 11 % bzw. unter 9 % senken. Zusammenbetrachtet zeigen die Ergebnisse eine Caspase-Aktivierung und daraus resultierende Apoptose-Induktion in AMO1-Zellen bei Behandlung mit hohen Konzentrationen von Cyclopamin und Vismodegib.



**Abb. 9: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie AMO1 nach 48 h Inkubation mit Cyclopamin in Kombination mit zVad.** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen aufgezeigt gegen EtOH/DMSO. \*\* (P < 0,01); \* (P < 0,05)



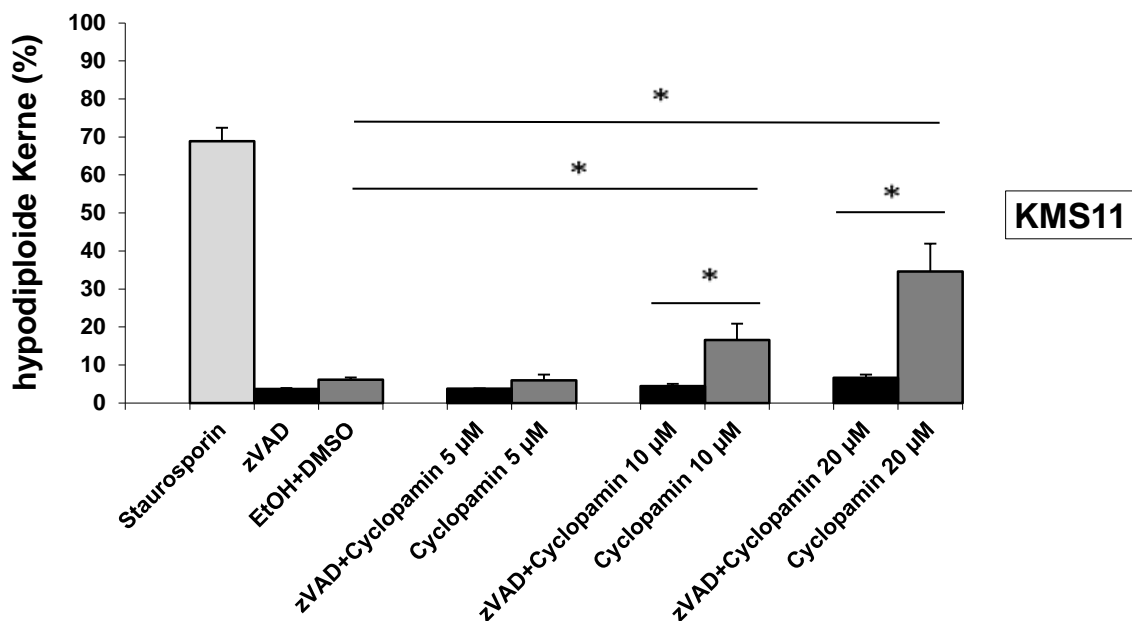
**Abb. 10: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie AMO1 nach 48 h Inkubation mit Vismodegib in Kombination mit zVad.** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen aufgezeigt gegen EtOH/DMSO. \* (P < 0,05)

### 3.1.2 Behandlung von KMS11 mit Cyclopamin/Vismodegib

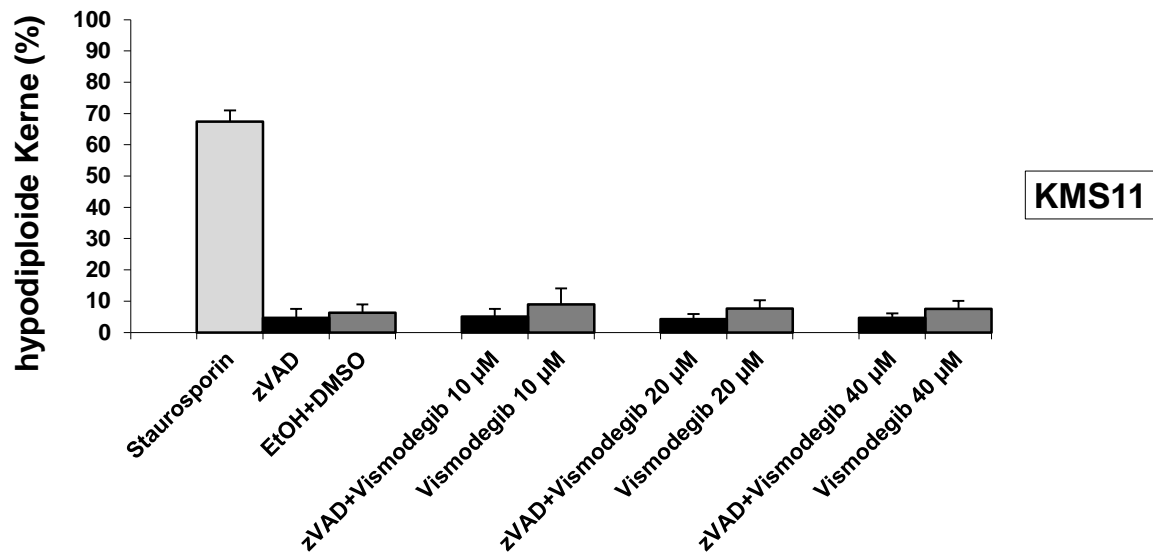
Während sich bei KMS11-Zellen nach der 48 h Behandlung mit Cyclopamin signifikante Steigerungen der Raten hypodiploider Kerne nachweisen ließen, konnte mit Vismodegib für keine der gewählten Konzentrationen ein derartiger Apoptose-Effekt ausgelöst werden.

Für Cyclopamin ließ sich bei der mittleren Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine Kernfragmentation von über 16 % feststellen, die sich bei der Höchstkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  signifikant auf über 34 % steigern ließ. Bei 5  $\mu\text{M}$  zeigte sich die Rate bezogen auf die Negativkontrolle unverändert.

Wie schon für die AMO1-Zellen gezeigt, wurden auch bei KMS11 die gesteigerten Raten hypodiploider Kerne durch die Zugabe von zVAD signifikant gesenkt. Hier fiel die Rate bei 10  $\mu\text{M}$  Cyclopamin auf unter 5 % und bei 20  $\mu\text{M}$  auf unter 7 %.



**Abb. 11: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie KMS11 nach 48 h Inkubation mit Cyclopamin in Kombination mit zVad.** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen aufgezeigt gegen EtOH/DMSO. \* ( $P < 0,05$ )



**Abb. 12: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie KMS11 nach 48 h Inkubation mit Vismodegib in Kombination mit zVad.** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen aufgezeigt gegen EtOH/DMSO. Die Ergebnisse sind zueinander nicht signifikant.

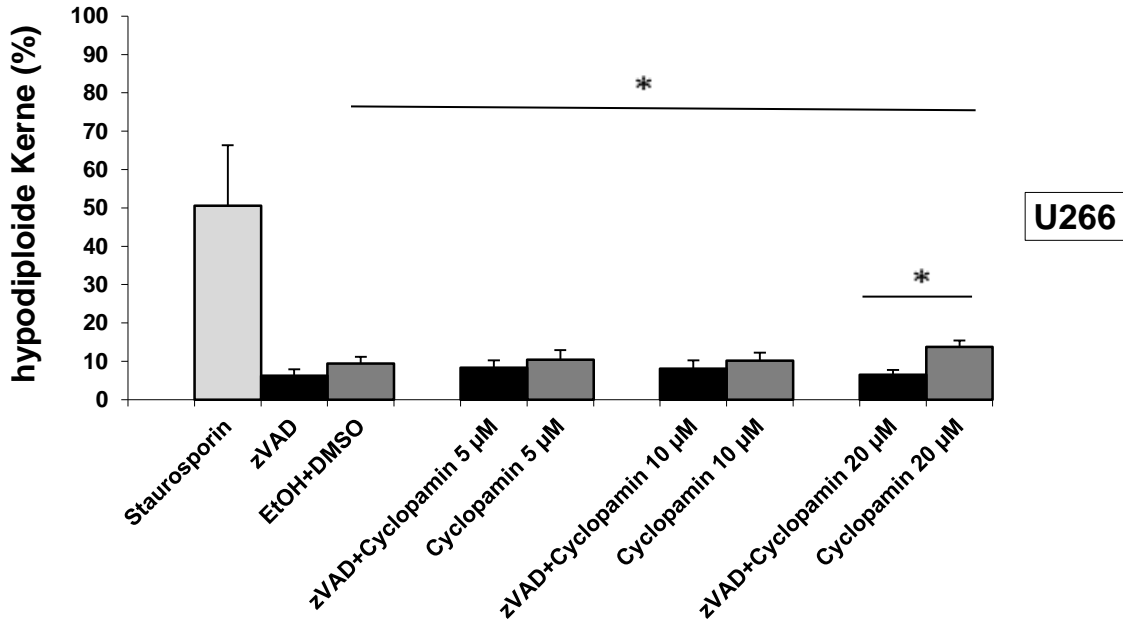
### 3.1.3 Behandlung von U266 mit Cyclopamin/Vismodegib

U266-Zellen weisen nach 48 h Behandlung mit Cyclopamin/Vismodegib ein ähnliches Apoptoseverhalten wie KMS11 auf. Während Vismodegib mit keiner der gewählten Konzentrationen einen relevanten Apoptose-Effekt bewirkte, zeigte Cyclopamin bei einer Konzentration von 20 µM eine signifikante Steigerung der Rate hypodiploider Kerne auf 14 % und deutete somit eine Tendenz zur Apoptose-Induktion bei hohen Konzentrationen an. Zur Überprüfung dieser Tendenz wurde für Cyclopamin eine weitere Messung durchgeführt, wobei man das Apoptoseverhalten der U266-Zellen bei einer zusätzlichen Konzentrationserhöhung betrachtete. Und in der Tat konnte bei einer Konzentration von 40 µM eine deutliche Steigerung der Kernfragmentation auf über 43 % beobachtet werden. Die Ergebnisse der zVad-Behandlung von U266 zeigten für Cyclopamin eine signifikante Senkung der Rate hypodiploider Kerne bei hoher Konzentration. Bei 20 µM Cyclopamin sank die Rate von 14 % auf unter 7 % und bei 40 µM von 43 % auf unter 11 %. Somit muss auch bei U266 von einer Caspase-Aktivierung und somit einer Apoptose-Induktion bei hohen Konzentrationen Cyclopamin ausgegangen werden. Mit Vismodegib konnte durch die Zugabe von zVad keine signifikanten Änderungen im Apoptoseverhal-

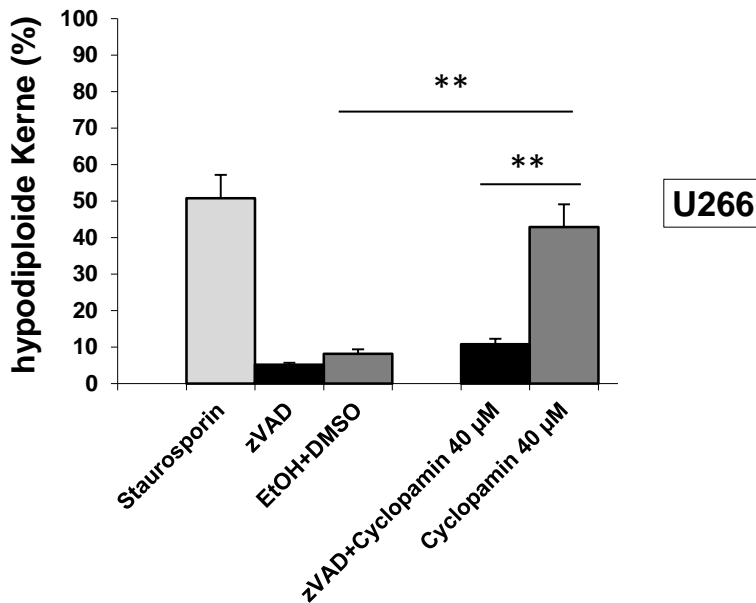


ten von U266-Zellen beobachtet werden, was auf eine Resistenz von U266-Zellen gegenüber Vismodegib schließen lässt.

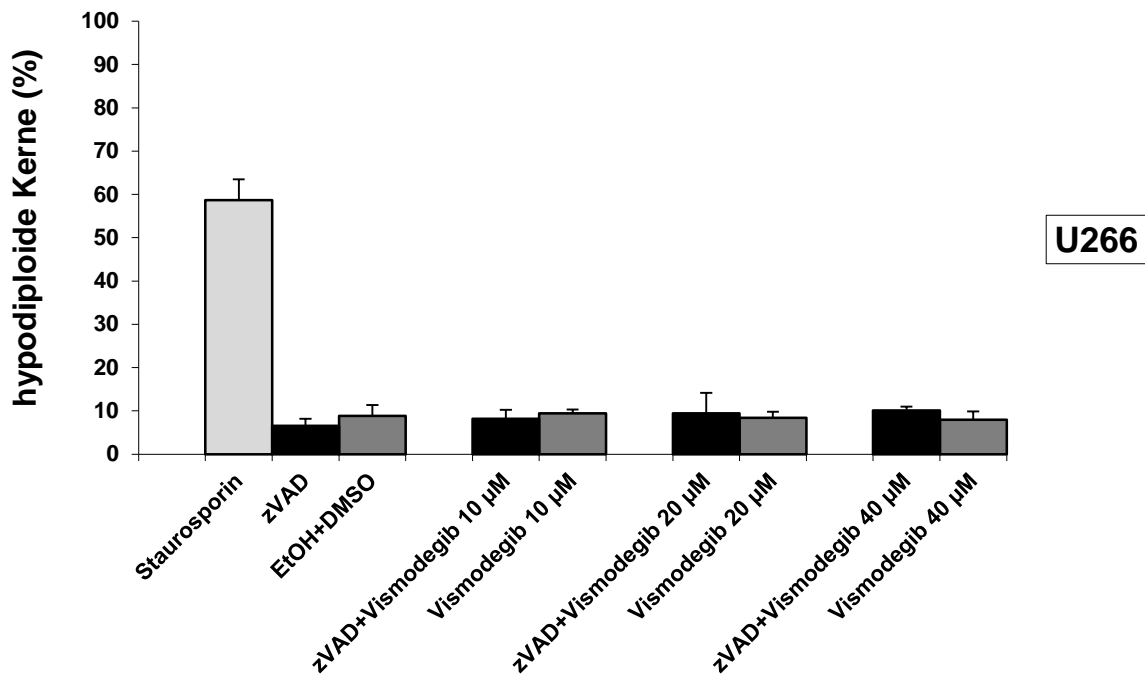
A)



B)



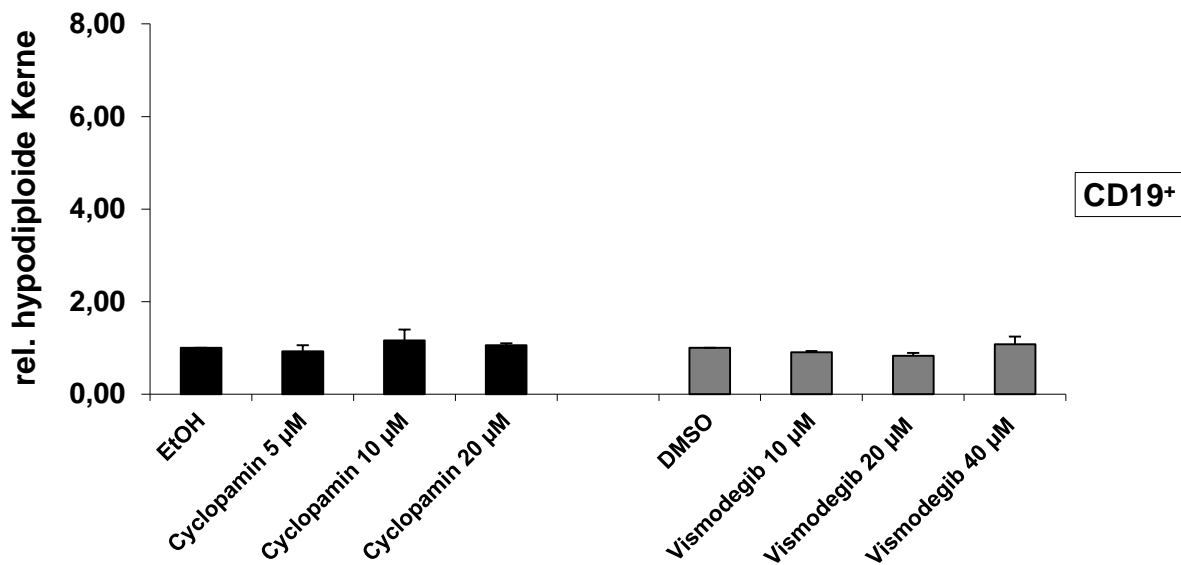
**Abb. 13: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie U266 nach 48 h Inkubation mit Cyclopamin in Kombination mit zVad. A) Messung mit den Standardkonzentrationen für Cyclopamin (5, 10, 20 µM); B) Extramessung mit höchster Cyclopamin-Konzentration von 40 µM; Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen aufgezeigt gegen EtOH/DMSO. \*\* (P < 0,01); \* (P < 0,05)**



**Abb. 14: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie U266 nach 48 h Inkubation mit Vismodegib in Kombination mit zVad.**Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen aufgezeigt gegen EtOH/DMSO. Die Ergebnisse sind zueinander nicht signifikant.

### 3.1.4 Behandlung von CD19<sup>+</sup>-B-Lymphozyten mit Cyclopamin/Vismodegib

Um die Wirkung von Cyclopamin und Vismodegib auf gesunde Zellen beurteilen zu können und insbesondere unspezifische, zytotoxische Effekte zu hoch gewählter Stoffkonzentration auszuschließen, wurden gesunde native CD19<sup>+</sup>-B-Lymphozyten als Vergleichszellen herangezogen. Die Abbildung 15 macht deutlich, dass bei Behandlung der CD19<sup>+</sup>-Zellen, sowohl mit Cyclopamin, als auch mit Vismodegib, keine der gewählten Konzentrationen eine signifikante Änderung der Kernfragmentation bewirkten.



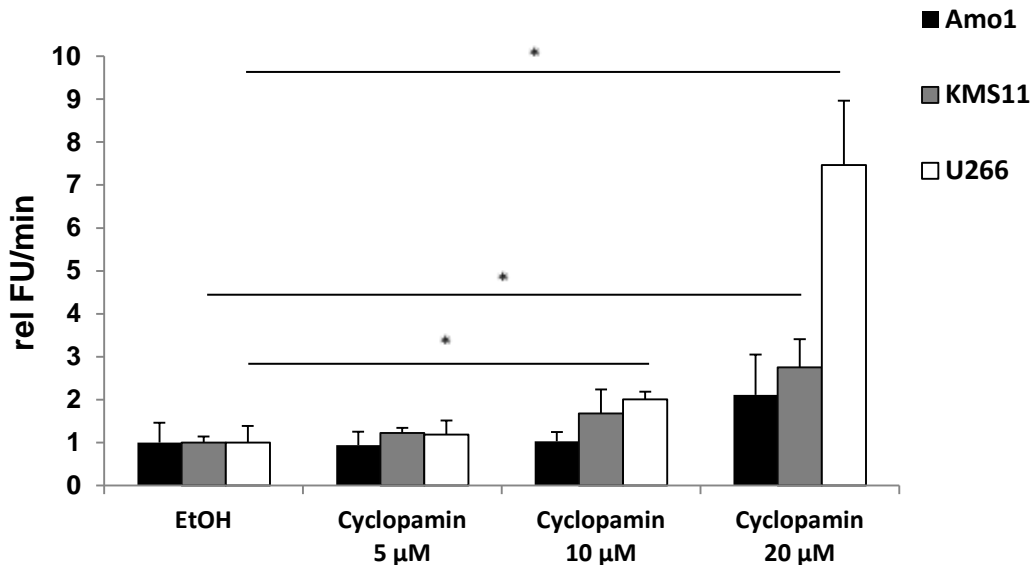
**Abb. 15: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid von nativen CD19<sup>+</sup>-B-Lymphozyten nach 48 h Inkubation mit Cyclopamin oder Vismodegib.** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen relativ zu EtOH- bzw. DMSO-behandelten Zellen von drei unabhängigen Versuchen. Die Ergebnisse sind zueinander nicht signifikant.

### 3.2 Auswertungen der Caspase 3-Aktivitätsuntersuchung

Parallel zu den durchflusszytometrisch bestimmten Ergebnissen wurden alle drei mit Cyclopamin oder Vismodegib behandelten Zelllinien zusätzlich auf die Caspase 3-Aktivität im ELISA-Reader untersucht. Nach heutigem Stand der Forschung stellt die Aktivierung der Caspase 3 den letzten Abschnitt der Kaskade für alle bislang bekannten, caspaseabhängigen Apoptosewege (extrinsisch, intrinsisch, endoplasmatisches Retikulum-stressinduziert) dar. Somit kann eine Erhöhung der Caspase-Aktivität als eindeutiges Charakteristikum für sich im Apoptoseprozess befindenden Zellen herangezogen werden.

### 3.2.1 Caspase 3-Aktivität nach Behandlung mit Cyclopamin

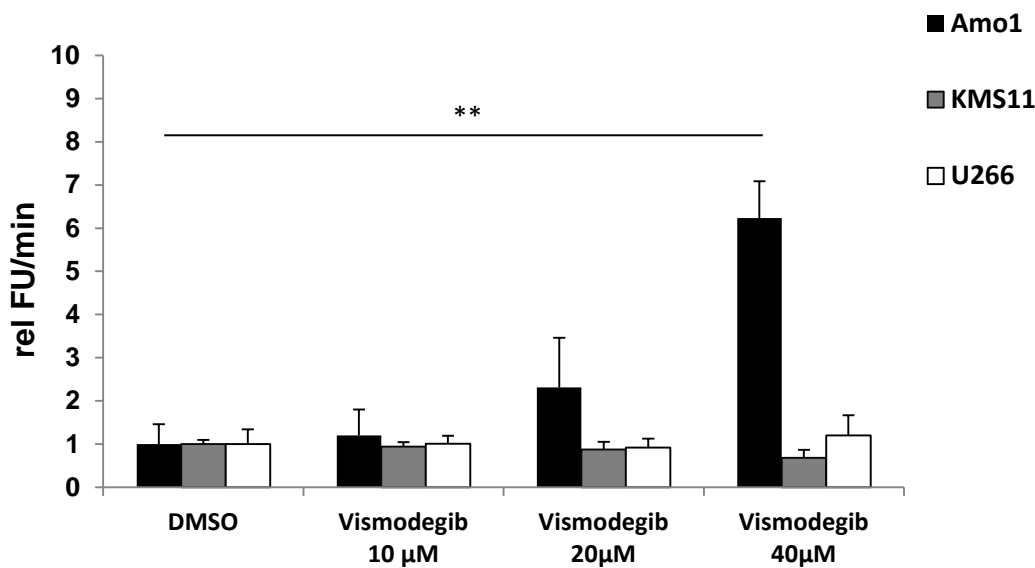
Die Auswertung für Cyclopamin zeigte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Caspase 3-Aktivität in allen drei Zelllinien. Insbesondere konnte eine signifikante Änderungen bei den gewählten Höchstkonzentrationen für U266 (10, 20  $\mu\text{M}$ ) und KMS11 (20  $\mu\text{M}$ ) gezeigt werden.



**Abb. 16: Analyse der Caspase-3-Aktivität in den Zelllinien AMO1, KMS11 und U266 durch fluorometrische Messung nach 48 h Inkubation mit Cyclopamin.** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen relativ zu EtOH-behandelten Zellen von drei unabhängigen Versuchen. \* ( $P < 0,05$ )

### 3.2.2 Caspase 3-Aktivität nach Behandlung mit Vismodegib

Auch für Vismodegib konnte in AMO1-Zellen eine konzentrationsabhängige Steigerung der Caspase 3-Aktivität festgestellt werden, welche sich bei einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  deutlich signifikant zeigte. Dagegen ließ sich für KMS11 und U266 keine Änderung der Aktivität nachweisen, was zusätzlich zu den Ergebnissen der Durchflusszytometrie, nochmals verdeutlichte, dass das Apoptoseverhalten dieser zwei Zelllinien durch eine Behandlung mit Vismodegib nicht beeinflusst werden kann.



**Abb. 17: Analyse der Caspase-3-Aktivität in den Zelllinien AMO1, KMS11 und U266 durch fluorometrische Messung nach 48 h Inkubation mit Vismodegib.** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen relativ zu DMSO-behandelten Zellen von drei unabhängigen Versuchen. \*\* (P < 0,01)

### 3.3 Auswertung der Kombinationsbehandlung von Cyclopin/Vismodegib mit weiteren therapeutischen Substanzen

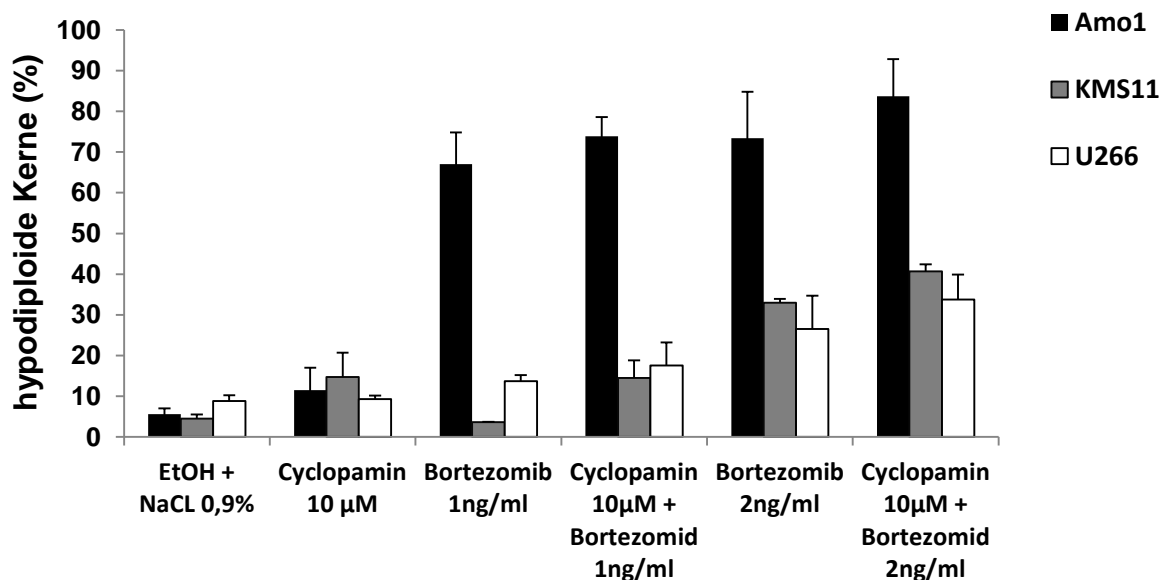
Aufgrund der stetig zunehmenden Resistenzen in der medikamentösen Therapie des Multiplen Myeloms, ist die Erforschung von neuen Kombinationsstrategien/-therapien von enormer Bedeutung, um diesem Trend entgegenzuwirken.

Zur Untersuchung eventueller additiver oder gar synergistischer Effekte bei der Behandlung von AMO1, KMS11 und U266-Zellen wurden die Sonic-Hedgehog-Inhibitoren Cyclopin und Vismodegib jeweils mit einer weiteren Substanz kombiniert. Dabei verwendete man zum einen die bereits in der klinischen Therapie des Multiplen Myeloms etablierten Medikamente Bortezomib und Lenalidomid. Zum anderen untersuchte man mit dem dualen PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235 einen weiteren interessanten Stoff, der sich bei Apoptosetestungen des Multiplen Myeloms bewährt hat (Baumann et al., 2009). Da sich von den drei Zelllinien eine Apoptose-Induktion durch Vismodegib nur für AMO1 gezeigt hatte, testete man die Kombinationsbehandlungen mit Vismodegib auch nur an dieser Zelllinie.

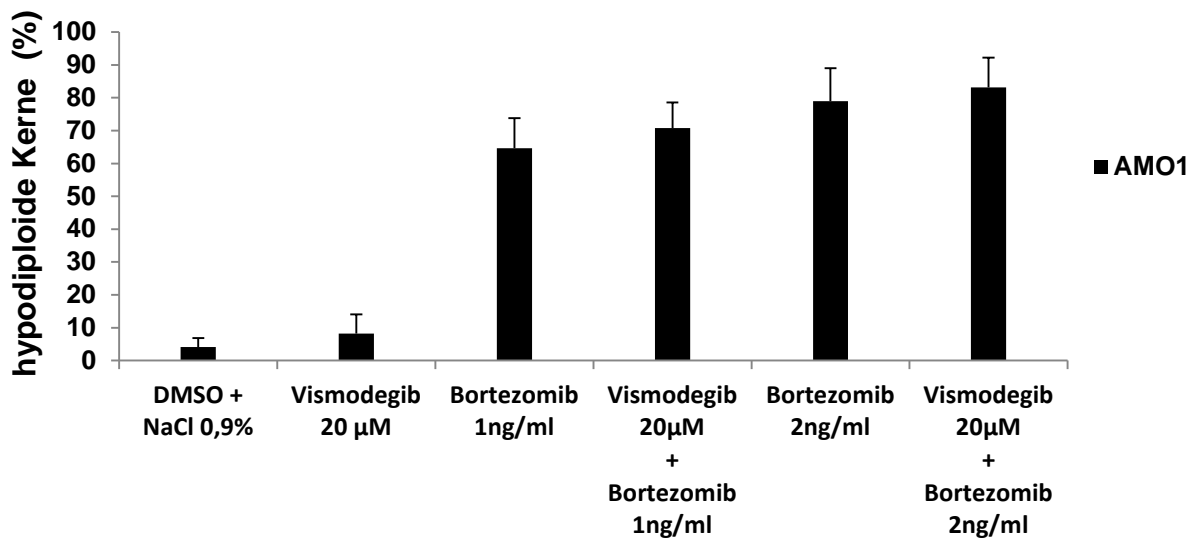
Für die jeweiligen Stoffe wurden die in 2.2.5.3 beschriebenen Konzentrationen verwendet. Die Kernfragmentation der einzelnen Zellansätze wurden auch in diesen Versuchen nach dem Nicolletti-Verfahren bestimmt und die durch PI-Messung erstellten Histogramme in Säulendiagrammen dargestellt.

### 3.3.1 Additiver Effekt von Bortezomib in Kombination mit Cyclopamin oder Vismodegib

In dieser Arbeit konnten bei der 48 h Behandlung von 10 µM Cyclopamin mit 1 ng/ml bzw. 2 ng/ml Bortezomib für alle untersuchten Zelllinien additive Effekte mit Steigerungen der Rate hypodiploider Kerne festgestellt werden. Verglichen mit den jeweiligen Substanzen alleine beobachtete man die maximale Rate apoptotischer Zellen bei der Kombinationsbehandlung mit 2 ng/ml Bortezomib. Hier stieg die Apoptoserate für U266 von 25 % auf 34 %, für KMS11 von 33 % auf 41 % und für AMO1-Zellen von 73 % auf über 84 %. Ähnliche Ergebnisse zeigten AMO1-Zellen bei der Behandlung mit 20 µM Vismodegib und Bortezomib, sodass auch hier von additiven apoptotische Effekten ausgegangen werden muss.



**Abb. 18: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinien AMO1, KMS11 und U266 nach 48 h Kombinationsbehandlung mit Cyclopamin und Bortezomib** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen aufgezeigt gegen EtOH/NaCl 0,9%. Die Ergebnisse sind zueinander nicht signifikant.



**Abb. 19: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie AMO1 nach 48 h Kombinationsbehandlung mit Vismodegib und Bortezomib.** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen aufgezogen gegen DMSO/NaCl 0,9%. Die Ergebnisse sind zueinander nicht signifikant.

### 3.3.2 Lenalidomid hat keinen additiven Effekt

Durch die Kombination mit Lenalidomid sollten Cyclopamin und Vismodegib auch mit dem zweiten Medikament getestet werden, welches sich in den letzten Jahren erfolgreich in der Therapie des Multiplen Myeloms etabliert hat. Auch hier untersuchte man eine mögliche Änderung der Kernfragmentation durch eventuelle additive oder gar synergistische Effekte. In der alleinigen Behandlung mit Lenalidomid wiesen AMO1, KMS11 und U266 alle ein relativ resistentes Apoptoseverhalten auf, wobei die höchste Rate hypodiploider Kerne mit nur 12 % in U266-Zellen beobachtet wurde. Auch in Kombination mit Cyclopamin zeigten alle Zelllinien im Hinblick auf zusätzliche apoptotische Effekte keine signifikanten Änderungen. Ebenfalls konnte bei der Kombination von Vismodegib und Lenalidomid für keine der gewählten Konzentrationen eine signifikante Steigerung der Kernfragmentation festgestellt werden.

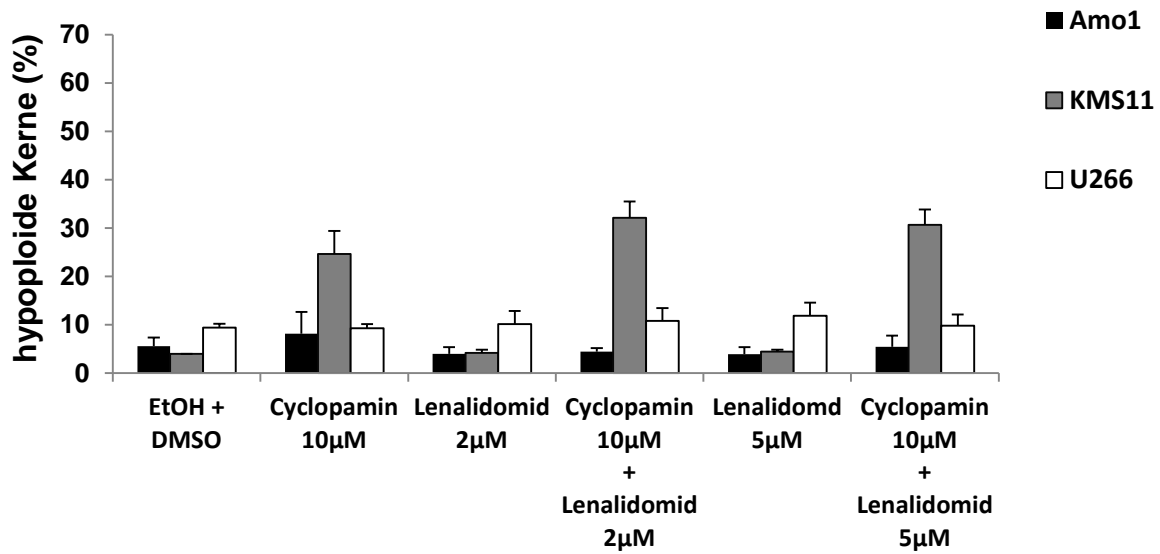


Abb. 20: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinien AMO1, KMS11 und U266 nach 48 h Kombinationsbehandlung mit Cyclopamin und Lenalidomid. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen aufgezeigt gegen EtOH/DMSO. Die Ergebnisse sind zueinander nicht signifikant.

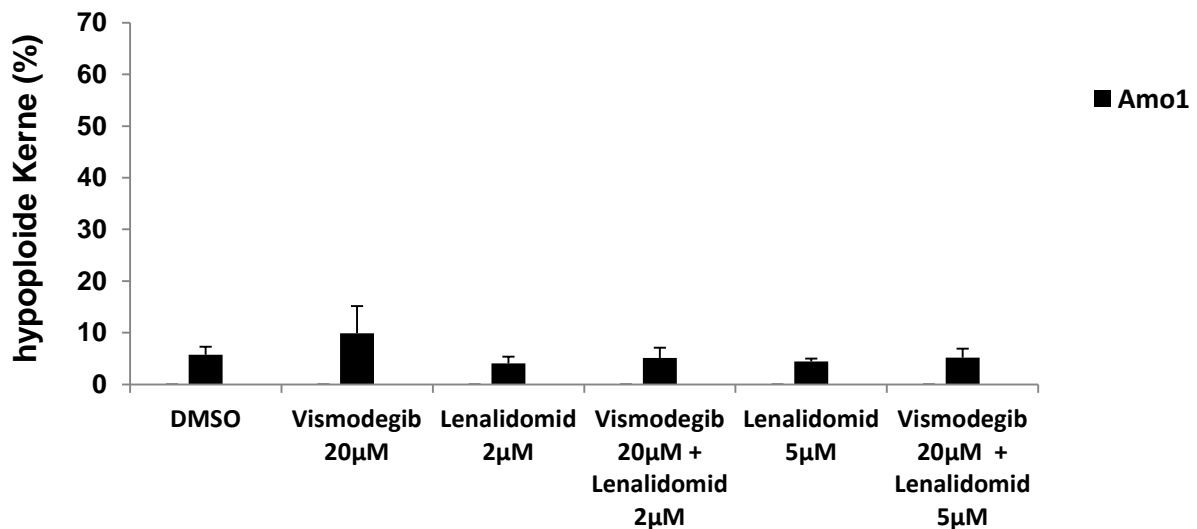


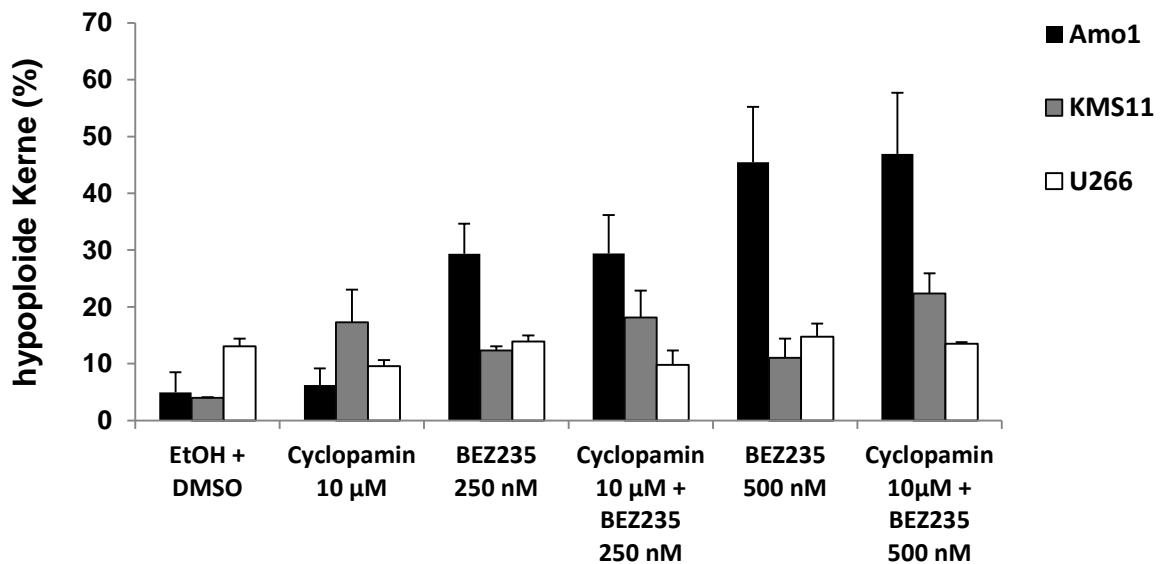
Abb. 21: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie AMO1 nach 48 h Kombinationsbehandlung mit Vismodegib und Lenalidomid. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen aufgezeigt gegen DMSO. Die Ergebnisse sind zueinander nicht signifikant.



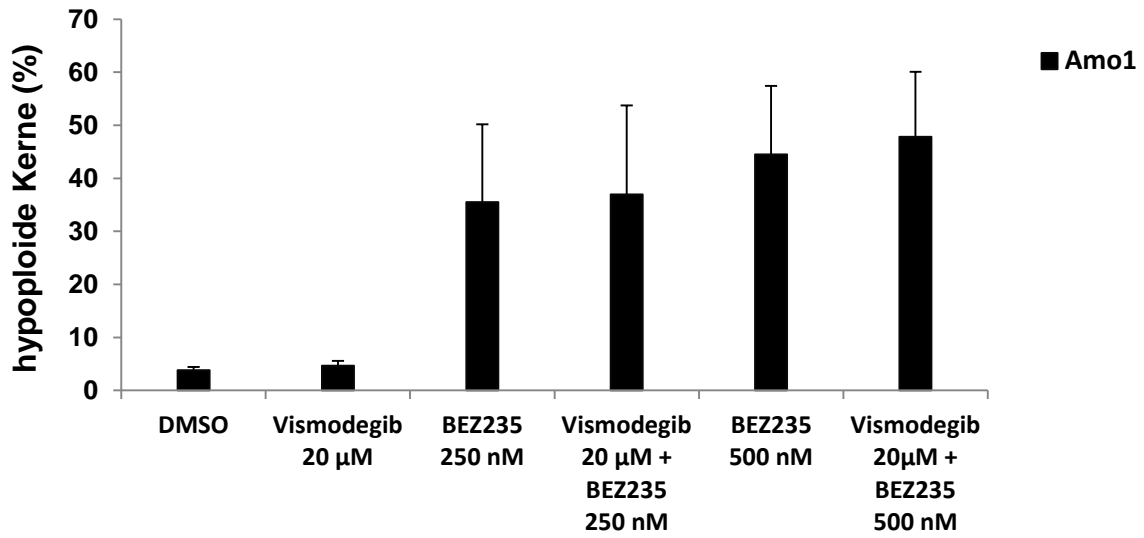
### 3.3.3 Auch NVP-BEZ235 bewirkt keinen zusätzlichen additiven Effekt

Bei der 48 h-Behandlung mit dem dualen PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235 wiesen die untersuchten Myelomzelllinien ein unterschiedlich empfindliches Apoptoseverhalten auf. Während nach Zugabe von 500 nM NVP-BEZ235 die Kernfragmentation der AMO1-Zellen auf über 45 % stieg, waren sowohl die KMS11- als auch die U266-Zellen relativ resistent mit Raten hypodiploider Kerne von unter 11 % bzw. unter 15 %.

Für alle untersuchten Zelllinien gemeinsam zeigte sich, dass durch Kombination von Cyclopamin bzw. Vismodegib mit NVP-BEZ235 in den gewählten Konzentrationen keine relevanten zusätzlichen Apoptose-Effekte ausgelöst werden können.



**Abb. 22: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinien AMO1, KMS11 und U266 nach 48 h Kombinationsbehandlung mit Cyclopamin und NVP-BEZ235.** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen aufgezeigt gegen EtOH/DMSO. Die Ergebnisse sind zueinander nicht signifikant.



**Abb. 23: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie AMO1 nach 48 h Kombinationsbehandlung mit Vismodegib und NVP-BEZ235.** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen aufgezeigt gegen DMSO. Die Ergebnisse sind zueinander nicht signifikant.

## 4. Diskussion

Um den Einfluss von Hedgehog-Inhibitoren auf das Apoptoseverhalten von Myelomzellen zu beurteilen und die scheinbar widersprüchlichen Aussagen von Dierks et al. (2007) und Peacock et al. (2007), auch anhand der eigenen Daten, richtig zu diskutieren, ist es wichtig, sich zunächst die Rahmenbedingungen der einzelnen Studien vor Augen zu führen.

Beide Studien untersuchten den Einfluss von Cyclopamin bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M auf zytotoxische Effekte bzw. auf das Apoptoseverhalten von Myelomzellen. Während Peacock et al. (2007) keine zytotoxischen Effekte feststellen konnten, wiesen Dierks et al. (2007) in ihren Versuchen die Induktion von Apoptose nach.

Dierks et al. (2007) verwendeten in ihrer Studie ausschließlich Myelomzellen aus frisch gewonnenem Knochenmark, welche sich entweder in Mäuse injiziert oder co-kultiviert mit Stromazellen vermehren ließen. Sie benutzten demnach Myelomzellen, die an das Umfeld des Knochenmarks gewöhnt und ohne das Beisein von Stromazellen nicht lebensfähig waren (Dierks et al., 2007). Obwohl Peacock et al. (2007) ihre genauen Daten über das Apoptoseverhalten von Myelomzellen nicht veröffentlichten, kann man ihren Aussagen und dem allgemeinen Aufbau ihrer Studie deutlich entnehmen, dass ihre Versuche an isoliert kultivierten Myelomzelllinien *in vitro* durchgeführt wurden.

Für das Verständnis ist es wichtig, sich bewusst zu machen, dass Myelomzelllinien in der Regel aus dem peripheren Blut gewonnen werden. Sie stellen somit bereits fortgeschrittene Myelomzellen oder gar Plasmazelleukämien mit vermehrt genetischen Aberrationen dar, die auf den parakrinen Einfluss des Knochenmarkstromas nicht mehr angewiesen sind (Schmidmaier et al., 2012; Zöllinger, 2008). Auch die in der vorliegenden Doktorarbeit verwendeten Myelomzelllinien wurden aus peripheren Blut (U266), Aszites (AMO1) oder Pleuraeffusionen (KMS11) entnommen und stellen somit alle Tumore dar, die zu Lebzeiten des Patienten das Knochenmark bereits verlassen hatten.

Vergleicht man die Hedgehog-Aktivität in Myelomzelllinien mit frisch aus Knochenmark gewonnenen Myelomzellen, so fällt auf, dass die Gene für Smo und Gli1/2, quasi die „Motoren“ des Hedgehog-Signalweges, in den verschiedenen Zellen unterschiedlich stark exprimiert sind. Während in der Mehrzahl der Fälle die Genexpression für eine dieser Proteine in primären Myelomzellen hochreguliert ist, kann dieses Phänomen an den

meisten Myelomzelllinien nicht beobachtet werden (Dierks et al., 2007; Peacock et al., 2007). Trotzdem konnte in einer neueren Studie an Western Blots gezeigt werden, dass auch in vielen Myelomzelllinien *in vitro* eine gewisse Smo-/Gli1-Aktivität existiert. Wie stark sich diese Aktivität allerdings im Vergleich zu frisch aus Knochenmark entnommenen Myelomzellen verhält, kann hier nur spekuliert werden, da diese Studie nicht mit primären Myelomzellen arbeitete und somit leider keine Vergleich-Blots existieren (Blotta et al., 2012).

Deutlichere Ergebnisse zu Unterschieden in der Hedgehog-Aktivität lieferten dagegen *in vivo* und *in vitro* Versuche mit NCI-H929-Zellen (Myelomzelllinie gewonnen aus einer Pleuraeffusion einer 62jährigen Frau mit Tumorrückfall). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von Smo in denjenigen Zellen, die sich im Knochenmark von Mäusen vermehrten, um ein Vielfaches erhöht war, verglichen mit den Zellen, die in einfachen Zellkulturen *in vitro* gehalten wurden (Peacock et al., 2007).

Zusammengefasst macht diese Gegenüberstellung von verschiedenen kultivierten Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* deutlich, dass das Umfeld von Myelomzellen für deren Hedgehog-Aktivität eine ganz entscheidende Rolle einnimmt. Wie schon von Dierks et al. (2007) beschrieben, führt die Interaktion mit Stromazellen des Knochenmarks direkt parakrin zu einer Steigerung der Hedgehog-Aktivität in Myelomzellen und bietet den Zellen Schutz vor Apoptose. Der Hedgehog-Ligand scheint dabei den Myelomzellen sogar ein stärkeres Überlebens-/Proliferationssignal zu vermitteln als IL-6, welches als einer der Hauptwachstumsfaktoren und Aktivatoren zahlreicher Signalwege in Myelomzellen gilt (Heinrich et al., 2003; Dierks et al., 2007). Fehlt dagegen der Stimulus der Stromazelle, wird die Hedgehog-Aktivität in der Myelomzelle heruntergefahren, wie Peacock et al. (2007) eindrücklich an NCI-H929-Zellen belegen konnten.

Es lässt sich daraus schlussfolgern, dass fortgeschrittene Myelomzellen, also auch Myelomzelllinien, die das Knochenmark verlassen haben, wahrscheinlich ihre Hedgehog-Aktivität herunterregulieren und autokrin auf einem niedrigeren Niveau aufrechterhalten. Dies würde auch erklären, warum erhöhte Genexpressionen des Indian-Hedgehog-Ligands in zahlreichen Myelomzelllinien gefunden werden können, während im Knochenmarksmilieu dieser Ligand vor allem von Stromazellen produziert wird (Dierks et al., 2007; Peacock et al. 2007).

Im Hinblick auf die scheinbar widersprüchlichen Aussagen nach Cyclopamin-Behandlung und auch zur Deutung der eigenen Ergebnisse könnten diese Unterschiede in der Hedgehog-Aktivität einen möglichen Erklärungsansatz für das unterschiedliche Apoptoseverhalten von Myelomzellen bieten, was im Folgenden näher erläutert werden soll.

Dass der Hedgehog-Signalweg das Apoptoseverhalten von Zellen beeinflusst und Hedgehog-Inhibitoren in der Lage sind, Apoptose zu induzieren, u.a. durch Herunterregulieren von Bcl2 und Aktivierung von Caspasen, konnte bereits an einer Vielzahl von Tumoren gezeigt werden (Dierks et al., 2007; Qualtrough et al., 2004; Samarzija und Beard, 2012). Dabei stehen zur Messung der Apoptose derzeit viele unterschiedliche Methoden zur Verfügung, die auf verschiedenen Wegen den programmierten Zelltod feststellen können. In der vorliegenden Doktorarbeit entschied man sich für das Verfahren nach Nicoletti, um einerseits Apoptoseeffekte über die Messung des DNA-Gehaltes in Myelomzellen nachzuweisen. Andererseits sollten durch die Nutzung des Caspase 3-Aktivitätsassays und durch den Gebrauch des Caspase-Inhibitors zVAD auch direkt Veränderungen in der Caspasen-Aktivierung gezeigt werden.

Die unter 3.1 dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass der Wirkstoff Cyclopamin in der Lage ist, auch in Myelomzelllinien Apoptose zu induzieren. Es zeigt sich jedoch anhand der Versuche, dass die Wirkung konzentrationsabhängig ist und dass eine erhöhte Schwellendosis von Cyclopamin überschritten werden muss, um Apoptoseeffekte auszulösen. Während KMS11-Zellen bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  signifikante Änderungen in der Rate hypodiploider Kerne aufweisen, benötigen AMO1- und U266-Zellen Cyclopamin-Konzentrationen über 20  $\mu\text{M}$ , um ihre Raten signifikant zu steigern. Bestätigt werden diese Ergebnisse sowohl durch die Caspase 3-Aktivitätsuntersuchungen als auch durch die zusätzliche Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor zVAD. Auch in diesen Versuchen zeigen sich erst bei höher gewählten Cyclopamin-Konzentrationen ab 10  $\mu\text{M}$ , meistens sogar erst ab 20  $\mu\text{M}$ , deutliche Änderungen in der Caspasen-Aktivität und somit im Apoptoseverhalten der einzelnen Zelllinien. Betrachtet man die Apoptoseeffekte bei 5  $\mu\text{M}$  Cyclopamin, so wird deutlich, dass bei dieser Konzentration alle untersuchten Myelomzelllinien noch keine Änderungen in der Kernfragmentation aufweisen. Demnach können anhand der eigenen Ergebnisse die Aussagen von Peacock et al. (2007)

bestätigt werden – lassen aber auch vermuten, dass bei ihren Versuchen an Myelomzelllinien *in vitro* keine höheren Cyclopamin-Konzentrationen zum Einsatz kamen und somit die Schwellendosis nicht überschritten wurde.

Es bleibt nun aber trotzdem die Frage zu klären, weshalb Dierks et al. (2007) in ihrer Studie bereits bei Cyclopamin-Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  deutliche Apoptoseeffekte an Myelomzellen nachweisen konnten. Wie zuvor bereits angedeutet, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Ursache für dieses Apoptoseverhalten in der Verwendung von primären Myelomzellen liegt, die, wie bereits diskutiert, eine höhere Hedgehog-Aktivität besitzen als isoliert kultivierte Myelomzelllinien. Dabei sollte man sich nochmals vor Augen führen, dass das Multiple Myelom ein heterogener Tumor ist, in dem viele verschiedene Signalwege (Abb. 3), in jeweils unterschiedlichem Maße, das Wachstum, die Proliferation und auch das Apoptoseverhalten beeinflussen (Kawauchi et al., 2009; Lunghi et al., 2008). Betrachtet man dabei den Hedgehog-Signalweg als weiteren Signalweg, der das Überleben von Myelomzellen mitbestimmt, so verdeutlicht die verstärkte Hedgehog-Aktivität im Beisein von Stromazellen, dass der Hedgehog-Signalweg insbesondere im Knochenmarksmilieu eine tragende Rolle im Hinblick auf das Apoptoseverhalten von Myelomzellen einnimmt (Dierks et al., 2007). Somit lässt sich nachvollziehen, dass bereits geringe Konzentrationen von Cyclopamin (5  $\mu\text{M}$ ) ausreichen, um in primären Myelomzellen, deren Überleben relativ stark an den Einfluss des Hedgehog-Signalweges gebunden ist, Apoptoseeffekte auszulösen (Dierks et al., 2007). Dagegen muss man davon ausgehen, dass in fortgeschrittenen Myelomzellen, die das Knochenmarksmilieu bereits verlassen haben, der Hedgehog-Signalweg seine führende Rolle verliert und womöglich, aufgrund weiterer genetischer Veränderungen, andere Signalwege das Apoptoseverhalten der Myelomzellen stärker bestimmen. Dies würde erklären, warum die doppelte bzw. die vierfache Konzentration von Cyclopamin (10-20  $\mu\text{M}$ ) in Myelomzelllinien benötigt wird, um ähnliche Apoptoseeffekte wie in primären Myelomzellen zu erzielen.

Zusammenfassend und mit Bezug auf die Ausgangsfragestellung verdeutlichen diese Ergebnisse, dass Cyclopamin auch in Myelomzelllinien *in vitro*, also ohne den parakrinen Stimulus von Stromazellen, in der Lage ist, Apoptose zu induzieren, wobei die Notwendigkeit erhöhter Wirkstoffkonzentrationen sehr wahrscheinlich der geringeren Hedgehog-Aktivität geschuldet ist. Das hierbei aber überhaupt eine Wirkung durch Hedgehog-

Inhibitoren auf das Apoptoseverhalten von Myelomzelllinien erzielt werden kann, spricht zudem für das Vorhandensein eines autokrinen Hedgehog-Modells, das Myelomzellen zumindest außerhalb des Knochenmarks nutzen, um sich vor Apoptose zu schützen.

Während Vismodegib als künstlich hergestellter Hedgehog-Inhibitor mit Cyclopamin strukturell nicht verwandt ist, gilt er als der potentere Wirkstoff, der mit hoher Affinität und Spezifität an Smo binden kann, um die Aktivität des Hedgehog-Signalweges zu unterdrücken (Robarge et al., 2009; Rudin et al., 2012). Da in der Literatur bislang noch keine Studien veröffentlicht wurden, die den Einfluss von Vismodegib auf Myelomzelllinien untersucht haben, erwartete man in Anbetracht der Cyclopamin-Ergebnisse eine verstärkte Wirkung auf das Apoptoseverhalten der Myelomzellen – eventuell schon bei geringeren Konzentrationen.

Die Ergebnisse der Versuche mit Vismodegib zeigen jedoch genau den gegenteiligen Effekt, wobei die Myelomzelllinien im Vergleich zu den Versuchen mit Cyclopamin deutlich schlechter bzw. überhaupt nicht auf Vismodegib ansprechen. Während sich für AMO1-Zellen erst bei Konzentrationen von 40 µM Vismodegib signifikante Steigerungen der Kernfragmentation feststellen lassen, weisen KMS11- und U266-Zellen ein resistentes Apoptoseverhalten sogar gegenüber hohen Vismodegib-Konzentrationen auf.

Auch wenn diese Ergebnisse eher unerwartet scheinen, so spiegeln sie dennoch mehr oder weniger die Resultate wieder, die in den letzten Jahren von vielen Autoren auch bei Untersuchungen von Vismodegib an anderen Tumoren beschrieben wurden. Außer den vielversprechenden Erfolgen bei der Behandlung von Basalzellkarzinomen oder auch Medulloblastomen mit Vismodegib konnten nämlich bislang bei keiner der Vielzahl anderer untersuchten Tumore derartig positive Ergebnisse nachgewiesen werden. Vielmehr zeigten einige klinischen Studien, dass solide Tumore wie Ovarial-, Kolorektal- oder auch das kleinzellige Bronchialkarzinom nur ein schwaches bis gar kein Ansprechen auf eine Behandlung mit Vismodegib vorweisen (Berlin et al., 2013; Kaye et al., 2012; Lorusso et al., 2011; Rudin et al., 2009; Sekulic et al., 2012; Tang et al., 2012).

Was die Ursache für diese Resistenz gegenüber dem Wirkstoff Vismodegib ist, die insbesondere an vielen fortgeschrittenen Tumoren beobachtet werden kann, war lange Zeit unklar und ist auch heute noch Gegenstand intensiver Forschung. Neuere Studien favorisieren hierbei das Auftreten von genetischen Aberrationen bzw. Mutationen in der

DNA, die den Phänotyp verändern und auf diese Weise die Resistenz der Tumorzelle beeinflussen (Loeb, 2011). So identifizierten Yauch et al. (2009) Mutationen in der DNA von Medulloblastomen, welche die Substitution einer Aminosäure an der Bindungsstelle von Smo bewirkt (Metcalf und de Sauvage, 2011). Dadurch verliert Vismodegib die Fähigkeit, an das Protein zu binden und seine antitumoröse Wirkung auszuüben, während die Aktivität von Smo durch die Mutation unbeeinflusst bleibt (Lin und Matsui, 2012). Da, wie bereits beschrieben, auch Myelomzelllinien fortgeschrittene Tumore darstellen, deren Phänotyp von genetischen Aberrationen verändert wurde, ist es durchaus denkbar, dass auch in KMS11- und U266-Zellen Mutationen im Smo-Protein vorhanden sind, welche die Bindung von Vismodegib und somit dessen antitumoröse Wirkung verhindern. Desweiteren würden solche Mutationen auch erklären, warum sich bei der Behandlung von Myelomzelllinien mit Cyclopamin bzw. Vismodegib derartig deutliche Unterschiede in der Wirkung auf das Apoptoseverhalten feststellen lassen, obwohl sich die beiden Stoffe lediglich strukturell, aber nicht im Wirkprinzip unterscheiden (Robarge et al., 2009). Inwiefern man diesen Wirkunterschied von Vismodegib auch bei primären, weniger fortgeschrittenen Myelomzellen beobachten kann, lässt sich in dieser Stelle nur spekulieren und müsste anhand von weiteren, insbesondere *in vivo* Studien überprüft werden. Eventuell wird hierbei auch die derzeit laufende und in der Einleitung erwähnte Studie von Huff (2011) neue Erkenntnisse über die Wirkung von Vismodegib auf Myelomzellen liefern können.

Einige Autoren sind nicht davon überzeugt, dass ein autokrines Hedgehog-Modell in Tumorzellen existiert, das die Zellen nutzen, um sich und benachbarte Tumorzellen zu stimulieren. Sie verweisen darauf, dass die meisten Daten für dieses Modell auf Studien basieren, die mit hohen Dosen von Cyclopamin oder anderen Smo-Inhibitoren durchgeführt wurden und daher eventuell nur unspezifische zytotoxische Effekte darstellen (Dormoy et al., 2009; Lin und Matsui, 2012; Zhang et al., 2007). Da sich nun auch in der vorliegenden Doktorarbeit erst bei höheren Cyclopamin- bzw. Vismodegib-Konzentrationen Apoptoseeffekte auf die untersuchten Myelomzelllinien nachweisen lassen, scheint es angebracht, diesen strittigen Sachverhalt näher zu betrachten. Auch wenn allgemein bekannt ist, dass alkalische Substanzen unspezifische Effekte auf Tumorzellen bewirken können, gibt es dennoch Hinweise darauf, dass Cyclopamin bzw.



Vismodegib auch in höheren Konzentrationen ihre Zytotoxizität nicht unspezifisch, sondern spezifisch über die Blockade des Hedgehog-Signalweges ausüben (Antoun et al., 1993; Bonke, 2010). So zeigen die eigenen Ergebnisse an gesunden Vergleichszellen (siehe 3.1.4), dass sich bei der Behandlung von aus peripherem Blut gewonnenen B-Lymphozyten mit den Smo-Inhibitoren auch in hohen Konzentrationen keine signifikanten Steigerungen der Kernfragmentation feststellen lassen. Da aus früheren Studien bekannt ist, dass native, nicht stimulierte CD19<sup>+</sup>-Zellen keine Smo-Aktivität besitzen, machen die eigenen Resultate deutlich, dass Cyclopamin bzw. Vismodegib auch in den gewählten Höchstkonzentrationen eher spezifisch über die Inhibition des Smo-Proteins wirken müssen, anstatt lediglich unspezifische zytotoxische Effekte auszuüben (Gorka, 2008).

Natürlich können native B-Lymphozyten (CD19<sup>+</sup>/CD138<sup>-</sup>) als Plasmazell-Vorläufer, schon aufgrund des Wechsels des Oberflächenmarkers, gesunde, differenzierte Plasmazellen (CD19<sup>-</sup>/CD138<sup>+</sup>) als Vergleichszellen von Myelomzelllinien nicht hundertprozentig ersetzen (Anderson und Carrasco, 2011; Matsui et al., 2004). Um jedoch lediglich der Frage nachzugehen, inwieweit unspezifische zytotoxische Effekte zu hoher Stoffkonzentrationen die Wirkung auf AMO1, KMS11 und U266 beeinflussen, ist die Wahl der Vergleichszellen hier eher als zweitrangig zu betrachten. Daher fiel, auch auf Grund der einfacheren Handhabung, die Wahl der Vergleichszellen auf die Plasmazell-Vorläufer.

Einen weiteren Hinweis darauf, dass Cyclopamin in Konzentrationen bis 20 µM spezifische, anstatt unspezifische Effekte auf Tumorzellen bewirkt, lieferte Bonke (2010) mit Untersuchungen an Leukämiezelllinien *in vitro*. Es zeigte sich dabei, dass bei der Behandlung mit Tomatidin, einem cyclopaminähnlichen Steroidalkaloid ohne nachweisbare Wirkung auf den Hedgehog-Signalweg, in Konzentrationen bis 20 µM im Vergleich zu Cyclopamin keine signifikanten Apoptoseeffekte auf Tumorzellen ausgelöst werden konnten (Bonke, 2010).

Anhand aller dargestellten Ergebnisse kann man daher schlussfolgern, dass einerseits die untersuchten gesunden B-Lymphozyten im Hinblick auf das Apoptoseverhalten unempfindlich gegenüber Hedgehog-Inhibitoren sind und dass andererseits die beobachteten Kernfragmentationen an Myelomzelllinien nach Behandlung mit Cyclopamin- bzw. Vismodegib spezifischer, anstatt unspezifischer Natur sein müssen. Des Weiteren un-

terstreichen diese Resultate erneut die Existenz eines autokrinen Hedgehog-Modells, das Myelomzelllinien bzw. fortgeschrittene Myelomzellen in Abwesenheit von Stromazellen nutzen, um sich vor Apoptose zu schützen.

In den letzten Jahren beobachtete man bei der Behandlung des Multiplen Myeloms immer mehr Fälle von Resistenzen gegenüber medikamentöser Monotherapie (Baumann et al., 2009). Es erschien daher sinnvoll Kombinationstherapien in der Klinik zu etablieren, um der Entwicklung derartiger Resistenzen entgegenzuwirken. Trotz des anfänglichen Erfolgs wurden in jüngster Zeit auch resistente Zellen gegen Wirkstoffkombinationen gefunden, sodass die Erforschung von immer neuen Kombinationstherapien von enormer Bedeutung ist, um auch in Zukunft Myelompatienten adäquat behandeln zu können.

Während der Proteasom-Inhibitor Bortezomib in der Klinik beim Multiplen Myelom in Kombinationstherapien mit anderen etablierten Medikamenten (VMP) bereits erfolgreich zur Anwendung kommt, sind bislang nur wenige Studien bekannt, die den Einfluss von Bortezomib auf den Hedgehog-Signalweg bzw. in Kombination mit Hedgehog-Inhibitoren untersucht haben.

An Medulloblastomen konnte gezeigt werden, dass Bortezomib durch Hemmung des Proteasoms in den Hedgehog-Signalweg eingreift, indem es das Protein Ptch erhöht und gleichzeitig Gli1 senkt, wodurch eine antitumoröse Wirkung ausgeübt wird (Taniguchi et al., 2009). Daher erschien es in der vorliegenden Arbeit sinnvoll, auch an Multiplen Myelomzellen zu prüfen, ob durch derartige Bortezomib-Effekte eventuell die Wirkung von Cyclopamin bzw. Vismodegib verstärkt werden könnte. Durch die zusätzliche Inhibition von Smo erwartete man eine Steigerung in der Apoptoserate - und in der Tat ließen sich in allen untersuchten Zelllinien für Cyclopamin und Vismodegib additive Effekte nachweisen.

Bestätigt werden die Ergebnisse durch eine kürzlich veröffentlichte Studie in der Multiplen Myelom-Forschung. Hier wurden ebenfalls additive Effekte bei der Kombinationsbehandlung von OPM1-Zellen (Myelomzelllinie gewonnen aus dem peripheren Blut einer 56jährigen Frau) mit Bortezomib und dem Smo-Inhibitor NVP-LED225 *in vitro* beobachtet (Blotta et al., 2012). Warum in beiden Fällen der Effekt *in vitro* nicht deutlicher ausfiel, kann eventuell darin begründet liegen, dass sowohl die Ptch-Erhöhung, als auch die

verwendeten Hedgehog-Inhibitoren, mit dem Smo-Protein alle das gleiche Ziel inhibierten und so die Hedgehog-Inhibition an diese Stelle ausgereizt wurde.

Daher scheint es für zukünftige Studien nicht uninteressant, Bortezomib auch mit Hedgehog-Inhibitoren zu kombinieren, die an anderer Stelle des Signalweges eingreifen, um so eventuell eine stärkere Steigerung der antitumorösen Wirkung zu erzielen.

Beim Immunmodulator Lenalidomid sind Kombinationstherapien mit anderen Medikamenten (u.a. Melphalan oder auch Bortezomib) zur Behandlung des Multiplen Myeloms derzeit Gegenstand intensiver Forschung (Rajkumar, 2012). Bislang ist seit 2007 in der Klinik nur die Kombination von Lenalidomid mit Dexamethason zugelassen. Vergeblich sucht man dagegen nach Studien, die sich mit der gleichzeitigen Behandlung von Lenalidomid und Hedgehog-Inhibitoren auf Myelomzellen beschäftigen.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist Lenalidomid ein Thalidomid-Analogon, welches über eine Vielzahl von Mechanismen seine antitumoröse Wirkung ausübt. Seine herausragende Wirkung erzielt Lenalidomid im Bereich der Interaktion von Tumorzellen mit Stromazellen des Knochenmarks (Bartlett et al., 2004). Hier verringert Lenalidomid das Wachstum der Myelomzellen durch Hemmung der Produktion von IL-6 und TNF $\alpha$  in den Stromazellen, welche ansonsten diese Wachstumsfaktoren vermehrt in die Peripherie abgeben würden (Bartlett et al., 2004). Die zusätzliche Senkung von VEGF im Gewebe führt zur Reduktion der Angiogenese und somit zu einer Unterversorgung des Tumors mit Nährstoffen. Durch Stimulation von T-Zellen kommt es zu erhöhter IL-2 und INF- $\gamma$  Produktion, wodurch natürliche Killerzellen aktiviert werden, die letztlich ebenfalls zu einer Reduktion entarteter Zellen führen (Bartlett et al., 2004). Alles in allem macht diese Aufzählung deutlich, wie wichtig das Umfeld der Myelomzellen für die antitumoröse Wirkung von Lenalidomid ist.

In der Literatur ist zwar eine direkte Wirkung von Lenalidomid durch Induktion einer Caspase-abhängigen Apoptose beschrieben. Da in der vorliegenden Arbeit die isoliert kultivierten Zelllinien aber in keiner Weise das Umfeld imitierten, das Lenalidomid benötigt, um seine komplexe antitumoröse Wirkung auszuüben, ist es nicht verwunderlich, dass alle untersuchten Zelllinien in dieser Konstellation ein relativ resistentes Apoptoseverhalten gegenüber Lenalidomid aufwiesen und U266-Zellen mit nur 11% die höchste Apoptoserate zeigten (Bartlett et al., 2004).

Trotzdem lassen sich aus dieser Versuchsreihe einige Hinweise auf die untersuchte Beziehung zwischen Lenalidomid und dem Hedgehog-Signalweg ableiten. Nach Auswertung der Ergebnisse scheint es jedenfalls unwahrscheinlich, dass Lenalidomid auf direktem Wege in den Hedgehog-Signalweg eingreift, um in Myelomzellen Apoptose zu induzieren. Auch deutet nichts darauf hin, dass Lenalidomid in der Lage ist, den Hedgehog-Signalweg dahingehend zu beeinflussen, dass die antitumoröse Wirkung von Smo-Inhibitoren verstärkt wird.

Um diese Aussage gänzlich zu verifizieren, müssten natürlich noch weitere Untersuchungen, insbesondere *in vivo* Studien, folgen. Das Beisein von Stromazellen könnte womöglich noch mehr Aufschluss über eine eventuelle Interaktion von Lenalidomid und dem Hedgehog-Signalweg geben. Denn wie oben erwähnt, ist Lenalidomid erst im Beisein von Stromazellen des Knochenmarks in der Lage, seine komplette Wirkung auf Myelomzellen auszuüben.

In neueren Studien konnten sowohl Baumann et al. (2009) als auch McMillan et al. (2009) nachweisen, dass der duale PI3K/mTOR-Inhibitor BEZ235 in mehreren Myelomzelllinien (RPMI-8226, NCI-H929, OPM-2, MM1.S, MM1.R) apoptotische Effekte auslöst und somit der PI3K-Signalweg, neben anderen Signalwegen, als ein spezifisches „Ziel“ in einer zukünftigen Myelomtherapie gelten kann. Des Weiteren konnten Mohan et al. (2012) und Buonamici et al. (2010) jeweils an Medulloblastomen nachweisen, dass einerseits der Sonic-Hedgehog-Ligand in der Lage ist, den PI3K-Signalweg direkt zu aktivieren, und dass andererseits eine Kombinationstherapie von NVP-BEZ235 mit dem Smo-Antagonisten NVP-LED235 das Auftreten von Resistenzen verringert und die antitumoröse Wirkung verstärkt. Aufgrund dieser beschriebenen Hedgehog/PI3K-Interaktionen in Medulloblastomen schien es für die vorliegende Doktorarbeit interessant, auch die Smo-Inhibitoren Cyclopamin und Vismodegib mit NVP-BEZ235 zu kombinieren und auf mögliche Hedgehog/PI3K-Wechselwirkungen in Myelomzelllinien (AMO1, KMS11, U266) zu testen.

Hierbei fiel zunächst auf, dass sich lediglich bei AMO1-Zellen durch eine Behandlung mit NVP-BEZ235 die Rate hypodiploider Kerne signifikant steigern ließ (45%), während KMS11 und U266 gegenüber diesem Wirkstoff ein resistentes Apoptoseverhalten zeigten. Dies bestätigt einerseits die Ergebnisse von Baumann et al. (2009), die bei der Be-

handlung von U266-Zellen mit NVP-BEZ235 ebenfalls ein resistentes Apoptoseverhalten nachwiesen. Andererseits verdeutlicht es erneut die Heterogenität von unterschiedlichen Myelomzellen bzw. Myelomzelllinien im Hinblick auf aktivierte Signalwege und der dadurch bedingten Schwierigkeit einer einheitlichen, spezifischen Therapie.

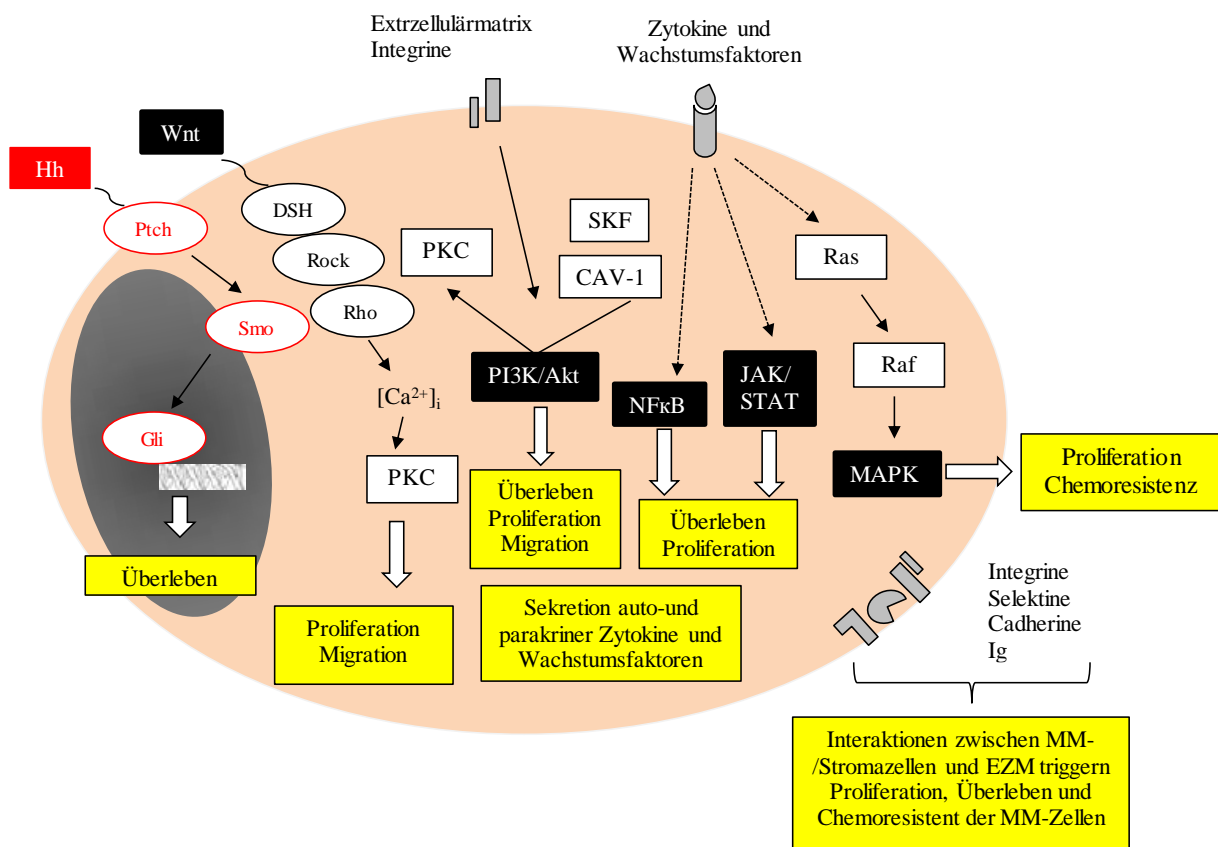
Auch konnte die zusätzliche Gabe von Hedgehog-Inhibitoren keine relevanten Steigerungen der Kernfragmentation in den untersuchten Zelllinien bewirken. Dies lässt darauf schließen, dass die Signalweg-Aktivitäten im Multiplen Myelom um einiges komplexer zu sein scheinen, als dass man Erkenntnisse von Hedgehog/PI3K-Interaktionen anderer Tumore einfach auf die Myelomzellen übertragen kann. Andererseits kann man jedoch auf Grund der Heterogenität der Myelomzellen auch nicht komplett ausschließen, dass in anderen Myelomzellen bzw. -zelllinien Interaktionen des Hedgehog- und PI3K-Signalweges auftreten und dass in diesen Tumorzellen womöglich eine Kombinationsbehandlung von Smo- und PI3K-Inhibitoren zu einer verstärkten Apoptosewirkung führt. Daher ist es notwendig, in Zukunft noch weitere Forschungen und Studien mit einer größeren Anzahl verschiedener primärer Myelomzellen oder Myelomzelllinien zu betreiben, um im Hinblick auf mögliche Signalweg-Interaktionen genauere und repräsentativere Ergebnisse zu erzielen.

#### **4.1 Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung**

Auch wenn die Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation immer noch den Goldstandard in der Behandlung des Multiplen Myeloms darstellt, so befinden sich die Therapiestrategien aufgrund vieler neuer Erkenntnisse aus Klinik und Forschung mehr und mehr im Wandel. Heute weiß man, dass eine Aktivierung bzw. Überstimulation verschiedener Signalwege, sowohl getriggert durch intrazellulär genetische Veränderungen als auch durch extrazelluläre Beeinflussung durch das Knochenmarksmilieu, die Pathogenese des Multiplen Myeloms maßgeblich bestimmen (Schmidmaier et al., 2012; Straka et al. 2012a). Hierdurch haben sich einige neue Wege für mögliche Therapieansätze ergeben.

Mit Thalidomid und Lenalidomid konnten sich im letzten Jahrzehnt bereits zwei neue Wirkstoffe in der Behandlung des Multiplen Myeloms erfolgreich etablieren, die ihre anti-tumoröse Wirkung insbesondere durch eine Unterbrechung der pathologischen Interaktionen von Myelomzellen mit dem Knochenmarksumfeld (u.a. Stromazellen, EZM) erzie-

len (Bartlett et al., 2004; Lang et al., 2012). Neben dieser Möglichkeit zur Intervention richtet sich der therapeutische Fokus in der Myelomforschung mittlerweile auch verstärkt auf die direkte Inhibition der verschiedenen aberranten Signalwege. Hierfür lieferten einige Studien u.a. mit der Inhibition des MEK/MAPK-Signalweges (PD98059, PD184352, PD0325901) oder auch des PI3K/Akt-Signalweges (NVP-BEZ235, Perfosin) bereits vielversprechende Ergebnisse (Baumann et al., 2009; Hideshima et al., 2006; Steinbrunn et al., 2012). Auch die Resultate der vorliegenden Arbeit unterstützen das neue Konzept der spezifischen Inhibition von aktivierten Signalwegen zur Myelomtherapie, indem sie zeigen, dass eine direkte Blockade des Hedgehog-Signalweges durch Smo-Inhibitoren zur Induktion von Apoptose in Myelomzelllinien führt. Die erzielten Ergebnisse belegen, dass, neben den unter 1.1.1 aufgeführten Signalwegen, auch der Hedgehog-Signalweg Einfluss auf das Apoptoseverhalten von Myelomzellen hat und somit als weiterer Signalweg in der Pathogenese des Multiplen Myeloms diskutiert werden muss (Abb. 24).



**Abb. 24:** Um den Hedgehog-Signalweg (Hh) erweiterte Darstellung der wichtigsten intrazellulären Signalwege im Multiplen Myelom (modifiziert nach Podar et al., 2009).

Inwiefern sich derartig spezifische Inhibitionen der verschiedenen Signalwege auch in der Praxis sinnvoll einsetzen lassen, werden zukünftige klinische Studien zeigen müssen. Aufgrund der Heterogenität der Signalwege in unterschiedlichen Myelomzellen werden dabei auch neue diagnostische Konzepte entwickelt werden müssen, um vor der Therapie für den jeweiligen Patienten festzustellen, welche Signalwege mehr und welche weniger aktiv das Tumorwachstum bestimmen. Eine solche spezielle Diagnostik, gepaart mit einer individuellen Therapie, könnte jedenfalls von vornherein resistente Substanzen ausschließen und die Wahl eines geeigneten Wirkstoffes bzw. einer Wirkstoffkombination deutlich erleichtern. Mit der Erweiterung der Knochenmarksdiagnostik durch Genexpressionsanalysen oder auch durch die FISH-Analytik, die bereits teilweise in der Lage sind, durch Bestimmung von Mutationen konstitutiv aktivierte Signalwege aufzudecken, wurden hierfür jedenfalls schon die ersten diagnostischen Weichen gestellt (Bacher et al., 2012).

Inwieweit und an welcher Stelle der Hedgehog-Signalweg dabei Einlass in eine spezifische Myelomtherapie erhalten könnte, bleibt jedoch abzuwarten. Während die eigenen Daten und auch diejenigen von Dierks et al. (2007) eine direkte apoptotische Wirkung auf die differenzierten krankheitsbestimmenden Myelomzellen favorisieren, sehen die Befürworter der kontrovers diskutierten Tumorstammzelltheorie die Rolle des Hedgehog-Signalweges eher in der Regulation von Tumorstammzellen (Peacock et al., 2007). Bevor diese Frage nicht endgültig geklärt ist, wird es schwierig sein, die Inhibition des Hedgehog-Signalweges in ein sinnvolles Therapiekonzept zu integrieren. Des Weiteren müsste anhand größerer Vergleichsstudien mit primären Myelomzellen und Myelozelllinien auch nochmals getestet werden, ob sich der Verdacht bestätigen lässt, dass der Hedgehog-Signalweg in Myelomzellen im Knochenmarksmilieu stärker aktiviert ist, als in fortgeschrittenen Tumorzellen, die das Knochenmarksmilieu bereits verlassen haben. Dann könnte folglich der Einsatz von Hedgehog-Inhibitoren als therapeutische Maßnahme insbesondere im frühen Stadium der Erkrankung in Erwägung gezogen werden. Trotz dieser vielen noch ungeklärten Fragen zeigt der bisherige Forschungsstand, dass eine individuelle Myelomtherapie mit spezifischer Inhibition von aberranten Signalwegen einen interessanten neuen Ansatz in der Myelomforschung darstellt und dass hierbei der Hedgehog-Signalweg womöglich in Zukunft auch ein erhebliches Gewicht in der Behandlung von Myelompatienten erlangen kann.

## 5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die systematische Untersuchung des Einflusses der Hedgehog-Inhibitoren Cyclopamin und Vismodegib auf das Apoptoseverhalten von Multiplen Myelomzellen *in vitro*. Dabei sollte geklärt werden, ob Hedgehog-Inhibitoren in der Lage sind Apoptose in Myelomzellen zu induzieren und damit der Hedgehog-Signalweg als weitere mögliche Zielstruktur in einer spezifischen Myelomtherapie diskutiert werden muss. Es sollten insbesondere auch die Aussagen zweier Studien von Dierks et al. (2007) und Peacock et al. (2007) aufgegriffen werden, die sich zuvor kontrovers zu diesem Thema geäußert haben.

Der Einfluss von Cyclopamin und Vismodegib wurde an den kultivierten Myelomzelllinien AMO1, KMS11 und U266 untersucht und mit deren Wirkung auf native B-Lymphozyten eines gesunden Spenders verglichen. Zur Aufdeckung einer möglichen Interaktion von Wirkstoffen bzw. von betroffenen Signalwegen wurden die Stoffe zudem jeweils mit einer weiteren therapeutischen Substanz kombiniert. Dabei verwendete man zum einen die Substanzen Bortezomib und Lenalidomid, um mögliche Interaktionen mit bereits etablierten Medikamenten in der klinischen Therapie des Multiplen Myeloms festzustellen. Zum anderen untersuchte man mit dem dualen PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235 eine weitere Substanz, die bereits in neueren Studien eine verstärkte antitumoröse Wirkung in Verbindung mit Hedgehog-Inhibitoren an Medulloblastomen erzielen konnte und somit eine mögliche Hedgehog/PI3K-Wechselwirkung auch in Multiplen Myelomzellen vermuten lässt.

Die Auswertung der Apoptoseeffekte erfolgte einerseits mittels Durchflusszytometrie anhand des Nicolleti-Verfahrens und andererseits über die Bestimmung der Caspase-Aktivität mittels Caspase 3-Aktivitätsassay und dem Gebrauch des Caspasen-Inhibitors zVAD.

Die Ergebnisse der Untersuchungen belegen, dass Hedgehog-Inhibitoren auch in Myelomzelllinien in der Lage sind, Apoptose zu induzieren. Es zeigte sich jedoch, dass die Apoptoseeffekte konzentrationsabhängig sind und erst bei höheren Konzentrationen signifikant werden. Unspezifische zytotoxische Effekte konnten durch die gesunden B-Lymphozyten weitestgehend ausgeschlossen werden, wobei eine potentielle toxische Wirkung der Substanzen anhand *in vivo* Versuchen noch zu untersuchen wäre. Des



Weiteren zeigten sich in den einzelnen Myelomzelllinien deutliche Unterschiede in den Ansprechraten auf Cyclopamin und Vismodegib. In Kombinationsbehandlungen der Hedgehog-Inhibitoren konnte man für den Proteasominhibitor Bortezomib additive apoptotische Effekte nachweisen, während sich für Lenalidomid und NVP-BEZ235 keine zusätzlichen Effekte ergaben.

Zusammenfassend zeigen die gewonnenen Ergebnisse, dass Hedgehog-Inhibitoren durchaus Potential besitzen, sich zukünftig in der Myelomtherapie zu etablieren. Es müssen jedoch weitere Untersuchungen folgen, insbesondere größere Vergleichsstudien mit primären Myelomzellen und Myelomzelllinien, um detaillierte Erkenntnisse über mögliche Beziehungen, Funktionen und Einflüsse des Hedgehog-Signalweges inner- und außerhalb des Knochenmarkmilieus zu erlangen und somit Hedgehog-Inhibitoren in eine Myelomtherapie zu integrieren.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der mehrschrittigen Pathogenese des Multiplen Myeloms .....	11
Abb. 2: Schematische Darstellung der wichtigsten intrazellulären Signalwege im Multiplen Myelom .....	12
Abb. 3: Diagnosekriterien zur Unterscheidung des Multiplen Myeloms von seinen unterschiedlichen Varianten .....	17
Abb. 4: Internationales Staging System (ISS) des Multiplen Myeloms.....	17
Abb. 5: Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms nach Durie und Salmon.....	18
Abb. 6: Schematische Darstellung des unterdrückten und des aktivierten Hedgehog-Signalweges .....	24
Abb. 7: Strukturformel von Cyclopamin.....	29
Abb. 8: Strukturformel von Vismodegib.....	30
Abb. 9: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie AMO1 nach 48 h Inkubation mit Cyclopamin in Kombination mit zVad .....	54
Abb. 10: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie AMO1 nach 48 h Inkubation mit Vismodegib in Kombination mit zVad .....	54
Abb. 11: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie KMS11 nach 48 h Inkubation mit Cyclopamin in Kombination mit zVad .....	55
Abb. 12: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie KMS11 nach 48 h Inkubation mit Vismodegib in Kombination mit zVad .....	56
Abb. 13: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie U266 nach 48 h Inkubation mit Cyclopamin in Kombination mit zVad .....	57
Abb. 14: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie U266 nach 48 h Inkubation mit Vismodegib in Kombination mit zVad .....	58
Abb. 15: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid von nativen CD19 <sup>+</sup> -B-Lymphozyten nach 48 h Inkubation mit Cyclopamin oder Vismodegib. ....	59
Abb. 16: Analyse der Caspase-3-Aktivität in den Zelllinien AMO1, KMS11 und U266 durch fluorometrische Messung nach 48 h Inkubation mit Cyclopamin .....	60
Abb. 17: Analyse der Caspase-3-Aktivität in den Zelllinien AMO1, KMS11 und U266 durch fluorometrische Messung nach 48 h Inkubation mit Vismodegib .....	61

Abb. 18: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinien AMO1, KMS11 und U266 nach 48 h Kombinationsbehandlung mit Cyclopamin und Bortezomib .....	62
Abb. 19: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie AMO1 nach 48 h Kombinationsbehandlung mit Vismodegib und Bortezomib .....	63
Abb. 20: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinien AMO1, KMS11 und U266 nach 48 h Kombinationsbehandlung mit Cyclopamin und Lenalidomid .....	64
Abb. 21: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie AMO1 nach 48 h Kombinationsbehandlung mit Vismodegib und Lenalidomid.....	64
Abb. 22: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinien AMO1, KMS11 und U266 nach 48 h Kombinationsbehandlung mit Cyclopamin und NVP-BEZ235 .....	65
Abb. 23: Messung der Kernfragmentation mittels Propidiumiodid der Zelllinie AMO1 nach 48 h Kombinationsbehandlung mit Vismodegib und NVP-BEZ235. ....	66
Abb. 24: Um den Hedgehog-Signalweg (Hh) erweiterte Darstellung der wichtigsten intrazellulären Signalwege im Multiplen Myelom .....	78

## 7. Literaturverzeichnis

Abedinpour F, Ostermann H, Fischer N. Klinik. In: Straka C, Dietzfelbinger H, HRSG. MANUAL Multiples Myelom. München: Zuckschwerdt, 2012: 33-39

Agyeman A, Mazumdar T, Houghton JA. Regulation of DNA damage following termination of Hedgehog (HH) survival signaling at the level of the GLI genes in human colon cancer. *Oncotarget* 2012; 3: 854-868

Altmeyer, 2010. Enzyklopädie der Dermatologie, Venerologie, Allergologie, Umweltmedizin. [http://win2079.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/640\\_1.htm](http://win2079.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/640_1.htm) (Zugriffsdatum: 24.03.2013)

Anderson KC, Carrasco RD. Pathogenesis of myeloma. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 249-274

Antoun MD, Mendoza NT, Ríos YR, Proctor GR, Wickramaratne DB, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Cytotoxicity of *Hymenocallis expansa* alkaloids. *J Nat Prod* 1993; 56: 1423-1425

Bacher U, Dietzfelbinger H, Kremer M, Liebisch P, Haferlach T. Knochenmarkdiagnostik. In: Straka C, Dietzfelbinger H, HRSG. MANUAL Multiples Myelom. München: Zuckschwerdt, 2012: 42-48

Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W, Piccirillo S, Vescovi AL, DiMeco F, Olivi A, Eberhart CG. Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells* 2007; 25: 2524-2533

Bartlett JB, Dredge K, Dalgleish AG. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 314-322

Baumann P, Mandl-Weber S, Oduncu F, Schmidmaier R The novel orally bioavailable inhibitor of phosphoinositol-3-kinase and mammalian target of rapamycin, NVP-BEZ235, inhibits growth and proliferation in multiple myeloma. *Exp Cell Res* 2009; 315: 485-497

Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004; 432: 324-331

Bergsagel DE, Valeriote FA. Growth characteristics of a mouse plasma cell tumor. *Cancer Res* 1968; 28: 2187–2196

Berlin J, Bendell JC, Hart LL, Firdaus I, Gore I, Hermann RC, Mulcahy MF, Zalupski MM, Mackey HM, Yauch RL, Graham RA, Bray GL, Low JA. A Randomized Phase II Trial of Vismodegib versus Placebo with FOLFOX or FOLFIRI and Bevacizumab in Patients with Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 258-267

Binns W, James LF, Shupe JL, Everett G. A congenital cyclopean-type malformation in lambs induced by maternal ingestion of range plant, *veratrum californicum*. *Am J Vet Res* 1963; 24: 1164-1175

Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 1996; 6: 298-304

Blotta S, Jakubikova J, Calimeri T, Roccaro AM, Amodio N, Azab AK, Foresta U, Mitsiades CS, Rossi M, Todoerti K, Molica S, Morabito F, Neri A, Tagliaferri P, Tassone P, Anderson KC, Munshi NC. Canonical and noncanonical Hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 2012; 120: 5002-5013

Bonke LA, 2010. Der Einfluss des Hedgehog-Signalweg-Inhibitors Cyclopamin auf Leukämiezellen *in vitro*.

<http://publikationen.ub.uni-frankfurt.de/frontdoor/index/index/docId/20420> (Zugriffsdatum: 24.03.2013)

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737

Bøyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 1976; 5: 9-15

Buonamici S, Williams J, Morrissey M, Wang A, Guo R, Vattay A, Hsiao K, Yuan J, Green J, Ospina B, Yu Q, Ostrom L, Fordjour P, Anderson DL, Monahan JE, Kelleher JF, Peukert S, Pan S, Wu X, Maira SM, García-Echeverría C, Briggs KJ, Watkins DN, Yao YM, Lengauer C, Warmuth M, Sellers WR, Dorsch M. Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med* 2010; 2: 51-70

Bumcrot DA, Takada R, McMahon AP. Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2294-2303

Burke R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ, Basler K. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 1999; 99: 803-815

Caspary T, Larkins CE, Anderson KV. The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture. *Dev Cell* 2007; 12: 767-778

Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev* 2002; 16: 2743-2748

Chen W, Ren XR, Nelson CD, Barak LS, Chen JK, Beachy PA, de Sauvage F, Lefkowitz RJ. Activity-dependent internalization of smoothed mediated by beta-arrestin 2 and GRK2. *Science* 2004; 306: 2257-2260

Cooper MK, Porter JA, Young KE, Beachy PA. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* 1998; 280: 1603-1607

Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, Reiter JF. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 2005; 437: 1018-1021

De Smaele E, Ferretti E, Gulino A. Vismodegib, a small-molecule inhibitor of the hedgehog pathway for the treatment of advanced cancers. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; 11: 707-718

Diebold J, Horny HP, Sotlar K. Formenkreis der Plasmazellneoplasien. In: Straka C, Dietzfelbin-ger H, HRSG. MANUAL Multiples Myelom. München: Zuckschwerdt, 2012: 22-26

Dierks C, Grbic J, Zirlik K, Beigi R, Englund NP, Guo GR, Veelken H, Engelhardt M, Mertelsmann R, Kelleher JF, Schultz P, Warmuth M. Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. Nat Med 2007; 13: 944-951

Dietzfelbinger H, Straka C. Geschichte des Multiplen Myeloms. In: Straka C, Dietzfelbin-ger H, HRSG. MANUAL Multiples Myelom. München: Zuckschwerdt, 2012: 1-5

Dormoy V, Danilin S, Lindner V, Thomas L, Rothhut S, Coquard C, Helwig JJ, Jacqmin D, Lang H, Massfelder T. The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. Mol Cancer 2009; 8: 123-138

Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. Cell 1993; 75: 1417-1430

Fu J, Rodova M, Roy SK, Sharma J, Singh KP, Srivastava RK, Shankar S. GANT-61 inhibits pancreatic cancer stem cell growth *in vitro* and in NOD/SCID/IL2R gamma null mice xenograft. Cancer Lett 2013; 330: 22-32

García-García MJ, Eggenschwiler JT, Caspary T, Alcorn HL, Wyler MR, Huangfu D, Rakeman AS, Lee JD, Feinberg EH, Timmer JR, Anderson KV. Analysis of mouse embryonic patterning and morphogenesis by forward genetics. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 5913-5919

Graf N, Hiller E, Straka C. Zweitneoplasien. In: Straka C, Dietzfelbinger H, HRSG. MA-NUAL Multiples Myelom. München: Zuckschwerdt, 2012: 188-191

Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimi-

zu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 200; 23: 3412-3420

Gorka O, 2008: Hedgehog-Signale in rheumatoid Arthritis. <http://www.freidok.uni-freiburg.de/volltexte/4328/> (Zugriffsdatum: 24.03.2013)

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B, Bale AE. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996; 85: 841-851

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; 374: 1-20

Hentrich M, Tischer J, Straka C, von Schilling C, Reibke R, Lang NK, Stötzer O, Kolb HJ. Allogene Stammzelltransplantation. In: Straka C, Dietzfelbinger H, HRSG. MANUAL Multiples Myelom. München: Zuckschwerdt, 2012: 99-106

Herold G. Innere Medizin. Köln: Herold, 2009

Hideshima T, Catley L, Yasui H, Ishitsuka K, Raje N, Mitsiades C, Podar K, Munshi NC, Chauhan D, Richardson PG, Anderson KC. Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood* 2006; 107: 4053-4062

Huff C, 2011: Vismodegib After Stem Cell Transplant in Treating Patients With High-Risk First Remission or Relapsed Multiple Myeloma. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01330173> (Zugriffsdatum: 24.03.2013)

Huntzicker EG, Estay IS, Zhen H, Lokteva LA, Jackson PK, Oro AE. Dual degradation signals control Gli protein stability and tumor formation. *Genes Dev* 2006; 20: 276-281



Hyman JM, Firestone AJ, Heine VM, Zhao Y, Ocasio CA, Han K, Sun M, Rack PG, Sinha S, Wu JJ, Solow-Cordero DE, Jiang J, Rowitch DH, Chen JK. Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 14132-14137

Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 2001; 15: 3059-3087

Ingram WJ, Wicking CA, Grimmond SM, Forrest AR, Wainwright BJ. Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene* 2002; 21: 8196-8205

Iwasaki M, Le AX, Helms JA. Expression of indian hedgehog, bone morphogenetic protein 6 and gli during skeletal morphogenesis. *Mech Dev* 1997; 69: 197-202

Jamur MC, Oliver C. Permeabilization of cell membranes. *Methods Mol Biol* 2010; 588: 63-66

Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH Jr, Scott MP. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 1996; 272: 1668-1671

Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 2004; 431: 707-712

Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network (review). *Int J Mol Med* 2006; 18: 1019-1023

Kawauchi K, Ogasawara T, Yasuyama M, Otsuka K, Yamada O. The PI3K/Akt pathway as a target in the treatment of hematologic malignancies. *Anticancer Agents Med Chem* 2009; 9: 550-559

Kaye SB, Fehrenbacher L, Holloway R, Amit A, Karlan B, Slomovitz B, Sabbatini P, Fu L, Yauch RL, Chang I, Reddy JC. A phase II, randomized, placebo-controlled study of

Vismodegib as maintenance therapy in patients with ovarian cancer in second or third complete remission. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 6509-6518

Keeler RF, Binns W. Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). V. Comparison of cyclopien effects of steroidal alkaloids from the plant and structurally related compounds from other sources. *Teratology* 1968; 1: 5-10

Khmel C, 2009: Ein weltweiter Meilenstein in der Zellanalyse - 40 Jahre Durchflusszytometrie. [http://www.presseportal.de/pm/44047/1424772/partec\\_gmbh/](http://www.presseportal.de/pm/44047/1424772/partec_gmbh/) (Zugriffsdatum: 24.03.2013)

Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ 3rd. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002; 346: 564-569

Lamerz R. Epidemiologie. In: Straka C, Dietzfelbinger H, HRSG. *MANUAL Multiples Myelom*. München: Zuckschwerdt, 2012: 6-13

Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, Dispenzieri A, Kumar S, Clark RJ, Baris D, Hoover R, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009; 113: 5412-5417

Lang NK, Dietzfelbinger H, Schmidmaier R, Bumeder I, Fischer N, Bassermann F. Neue Substanzen in der Therapie des multiplen Myeloms. In: Straka C, Dietzfelbinger H, HRSG. *MANUAL Multiples Myelom*. München: Zuckschwerdt, 2012: 133-147

Lauth M, Bergström A, Shimokawa T, Toftgård R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 8455-8460

Lin TL, Wang QH, Brown P, Peacock C, Merchant AA, Brennan S, Jones E, McGovern K, Watkins DN, Sakamoto KM, Matsui W. Self-renewal of acute lymphocytic leukemia cells is limited by the Hedgehog pathway inhibitors cyclopamine and IPI-926. *PLoS One* 2010; 5: e15262

Lin TL, Matsui W. Hedgehog pathway as a drug target: Smoothed inhibitors in development. *Onco Targets Ther* 2012; 5: 47-58

Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet* 1998; 20: 58-61

Liu Z, Li T, Reinhold MI, Naski MC. MEK1-RSK2 contributes to hedgehog signaling by stabilizing GLI2 transcription factor and inhibiting ubiquitination. *Oncogene* 2014; 33: 65-73

Loeb LA. Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 450-457

Lorusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Tibes R, Weiss GJ, Borad MJ, Hann CL, Brahmer JR, Chang I, Darbonne WC, Graham RA, Zerivitz KL, Low JA, Von Hoff DD. Phase I trial of hedgehog pathway inhibitor Vismodegib (Vismodegib) in patients with refractory, locally advanced or metastatic solid tumors. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 2502-2511

Lunghi P, Giuliani N, Mazzera L, Lombardi G, Ricca M, Corradi A, Cantoni AM, Salvatore L, Riccioni R, Costanzo A, Testa U, Levrero M, Rizzoli V, Bonati A. Targeting MEK/MAPK signal transduction module potentiates ATO-induced apoptosis in multiple myeloma cells through multiple signaling pathways. *Blood* 2008; 112: 2450-2462.

Madhala-Levy D, Williams VC, Hughes SM, Reshef R, Halevy O. Cooperation between Shh and IGF-I in promoting myogenic proliferation and differentiation via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways requires Smo activity. *J Cell Physiol* 2012; 227: 1455-1464

Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, Smith BD, Civin CI, Jones RJ. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 2004; 103: 2332-2336

Matsui W, Wang Q, Barber JP, Brennan S, Smith BD, Borrello I, McNiece I, Lin L, Ambinder RF, Peacock C, Watkins DN, Huff CA, Jones RJ. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res* 2008; 68: 190-197

McMillin DW, Ooi M, Delmore J, Negri J, Hayden P, Mitsiades N, Jakubikova J, Maira SM, Garcia-Echeverria C, Schlossman R, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC, Mitsiades CS. Antimyeloma activity of the orally bioavailable dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer Res* 2009; 69: 5835-5842

Merchant AA, Matsui W. Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3130-3140

Metcalf C, de Sauvage FJ. Hedgehog fights back: mechanisms of acquired resistance against Smoothed antagonists. *Cancer Res* 2011; 71: 5057-5061

Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990; 11: 231-238

Mohan AL, Friedman MD, Ormond DR, Tobias M, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. PI3K/mTOR signaling pathways in medulloblastoma. *Anticancer Res* 2012; 32: 3141-3146.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991; 139: 271-279

Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 1980; 287: 795-801

Ok CY, Singh RR, Vega F. Aberrant activation of the hedgehog signaling pathway in malignant hematological neoplasms. *Am J Pathol* 2012; 180: 2-11

Onkopedia, 2011. Leitlinien – Multiples Myelom. <http://www.dgho-onkopedia.de/de/mein-onkopedia/leitlinien/multiples-myelom> (Zugriffsdatum: 24.03.2013)

Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2011; 364: 1046-1060

Pan D, Li Y, Li Z, Wang Y, Wang P, Liang Y. Gli inhibitor GANT61 causes apoptosis in myeloid leukemia cells and acts in synergy with rapamycin. *Leuk Res* 2012; 36: 742-748

Peacock CD, Wang Q, Gesell GS, Corcoran-Schwartz IM, Jones E, Kim J, Devereux WL, Rhodes JT, Huff CA, Beachy PA, Watkins DN, Matsui W. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 4048-4053

Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, Taylor FR, Wang EA, Galdes A. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* 1998; 273: 14037-14045

Philipp M, Fralish GB, Meloni AR, Chen W, MacInnes AW, Barak LS, Caron MG. Smoothed signaling in vertebrates is facilitated by a G protein-coupled receptor kinase. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 5478-5489

Philipp M, Caron MG. Hedgehog signaling: is Smo a G protein-coupled receptor? *Curr Biol* 2009; 19: 125-127

Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia* 2009; 23: 10–24

Pola R, Ling LE, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, Blake Pepinsky R, Shapiro R, Taylor FR, Baker DP, Asahara T, Isner JM. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med* 2001; 7: 706-711

Porter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 1996; 274: 255-259

Qualtrough D, Buda A, Gaffield W, Williams AC, Paraskeva C. Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment. *Int J Cancer* 2004; 110: 831-837

Rajkumar SV, Mesa RA, Fonseca R, Schroeder G, Plevak MF, Dispenzieri A, Lacy MQ, Lust JA, Witzig TE, Gertz MA, Kyle RA, Russell SJ, Greipp PR. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2210-2216

Rajkumar SV. Doublets, triplets, or quadruplets of novel agents in newly diagnosed myeloma? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012; 2012: 354-361

Riobo NA, Lu K, Emerson CP Jr. Hedgehog signal transduction: signal integration and cross talk in development and cancer. *Cell Cycle* 2006; 5: 1612-1615

Robarge KD, Brunton SA, Castaneda GM, Cui Y, Dina MS, Goldsmith R, Gould SE, Guichert O, Gunzner JL, Halladay J, Jia W, Khojasteh C, Koehler MF, Kotkow K, La H, Lalonde RL, Lau K, Lee L, Marshall D, Marsters JC Jr, Murray LJ, Qian C, Rubin LL, Salphati L, Stanley MS, Stibbard JH, Sutherlin DP, Ubhayaker S, Wang S, Wong S, Xie M. Vismodegib-a potent inhibitor of the hedgehog pathway. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 5576-5581

Robert Koch-Institut, 2013: Zentrum für Krebsregisterdaten.

[http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/krebs\\_in\\_deutschland\\_inhalt.html?nn=2378942](http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_inhalt.html?nn=2378942) (Zugriffdatum: 24.03.2013)

Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, Leleu X, Azab AK, Azab F, Runnels J, Jia X, Ngo HT, Melhem MR, Lin CP, Ribatti D, Rollins BJ, Witzig TE, Anderson KC, Ghobrial IM. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood* 2009; 113: 6669-6680

Romer JT, Kimura H, Magdaleno S, Sasai K, Fuller C, Baines H, Connelly M, Stewart CF, Gould S, Rubin LL, Curran T. Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice. *Cancer Cell* 2004; 6: 229-240

Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, Holcomb T, Stinson J, Gould SE, Coleman B, LoRusso PM, Von Hoff DD, de Sauvage FJ, Low JA. Treatment

of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor Vismodegib. *N Engl J Med*. 2009; 361: 1173-1178

Rudin CM. Vismodegib. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 3218-3222

Samarzija I, Beard P. Hedgehog pathway regulators influence cervical cancer cell proliferation, survival and migration. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 425: 64-69

Sandhiya S, Melvin G, Kumar SS, Dkhar SA. The dawn of hedgehog inhibitors: Vismodegib. *J Pharmacol Pharmacother* 2013; 4: 4-7

Schmidmaier R, Bassermann F, Lamerz R. Klinisch relevante Grundzüge zur Pathogenese. In: Straka C, Dietzfelbinger H, HRSG. *MANUAL Multiples Myelom*. München: Zuckschwerdt, 2012: 14-21

Schmidmaier R, Franke D. Diagnostisches Konzept. In: Straka C, Dietzfelbinger H, HRSG. *MANUAL Multiples Myelom*. München: Zuckschwerdt, 2012: 40-41

Schönermarck U, Fischereider M, Schmidmaier R. Renale Komplikationen. In: Straka C, Dietzfelbinger H, HRSG. *MANUAL Multiples Myelom*. München: Zuckschwerdt, 2012: 171-179

Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD, Solomon JA, Yoo S, Arron ST, Friedlander PA, Marmur E, Rudin CM, Chang AL, Low JA, Mackey HM, Yauch RL, Graham RA, Reddy JC, Hauschild A. Efficacy and safety of Vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2012; 366: 2171-2179

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85

Stanton BZ, Peng LF, Maloof N, Nakai K, Wang X, Duffner JL, Taveras KM, Hyman JM, Lee SW, Koehler AN, Chen JK, Fox JL, Mandinova A, Schreiber SL. A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat Chem Biol* 2009; 5: 154-156

Stanton BZ, Peng LF. Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway. *Mol Biosyst* 2010; 6: 44-54

Statistisches Bundesamt, 2012: Todesursachen - Anzahl der Gestorbenen nach ausgewählten Todesursachen 2011.

<http://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html> (Zugriffdatum: 24.03.2013)

Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, Beermann F, Ruiz I, Altaba A. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 5895-5900

Steinbrunn T, Stühmer T, Sayehli C, Chatterjee M, Einsele H, Bargou RC. Combined targeting of MEK/MAPK and PI3K/Akt signalling in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2012; 159: 430-440

Straka C, Oduncu FS, Franke D, Dietzfelbinger H. Therapeutisches Konzept. In: Straka C, Dietzfelbinger H, HRSG. *MANUAL Multiples Myelom*. München: Zuckschwerdt, 2012a: 85-87

Straka C, Hentrich M, Fischer N, Kolb HJ, Oduncu FS, Schmidmaier R, Emmerich B. Autologe Blutstammzelltransplantation. In: Straka C, Dietzfelbinger H, HRSG. *MANUAL Multiples Myelom*. München: Zuckschwerdt, 2012b: 88-98

Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP, Beachy PA. Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 2000; 406: 1005-1009

Tang JY, Mackay-Wiggan JM, Aszterbaum M, Yauch RL, Lindgren J, Chang K, Coppola C, Chanana AM, Marji J, Bickers DR, Epstein EH Jr. Inhibiting the hedgehog pathway in patients with the basal-cell nevus syndrome. *N Engl J Med* 2012; 366: 2180-2188

Taniguchi E, Cho MJ, Arenkiel BR, Hansen MS, Rivera OJ, McCleish AT, Qualman SJ, Guttridge DC, Scott MP, Capecchi MR, Keller C. Bortezomib reverses a post-



translational mechanism of tumorigenesis for patched1 haploinsufficiency in medulloblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53: 136-144

Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, Stavrou T, Scherer SW, Dura WT, Wainwright B, Squire JA, Rutka JT, Hogg D. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 2002; 31: 306-310

Tukachinsky H, Lopez LV, Salic A. A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu-Gli protein complexes. *J Cell Biol* 2010; 191: 415-428

U.S. National Institutes of Health, 2013: ClinicalTrials.

<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=hedgehog> (Zugriffsdatum: 24.03.2013)

Van der Spek E, Bloem AC, Lokhorst HM, van Kessel B, Bogers-Boer L, van de Donk NW. Inhibition of the mevalonate pathway potentiates the effects of lenalidomide in myeloma. *Leuk Res* 2009; 33: 100-108

Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, Weiss GJ, Borad MJ, Hann CL, Brahmer JR, Mackey HM, Lum BL, Darbonne WC, Marsters JC Jr, de Sauvage FJ, Low JA. Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361: 1164-1172

Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 2003; 422: 313-317

Wick M, Lamerz R, Bartl R. Klinisch-chemische Diagnostik. In: Straka C, Dietzfelbinger H, HRSG. *MANUAL Multiples Myelom*. München: Zuckschwerdt, 2012: 49-56

Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas JM, Lam CW, Hynes M, Goddard A, Rosenthal A, Epstein EH Jr, de Sauvage FJ. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 1998; 391: 90-92

Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, Tang T, Tian H, Ahn CP, Marshall D, Fu L, Januario T, Kallop D, Nannini-Pepe M, Kotkow K, Marsters JC, Rubin LL, de Sauvage FJ. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* 2008; 455: 406-410

Yauch RL, Dijkgraaf GJ, Aliche B, Januario T, Ahn CP, Holcomb T, Pujara K, Stinson J, Callahan CA, Tang T, Bazan JF, Kan Z, Seshagiri S, Hann CL, Gould SE, Low JA, Rudin CM, de Sauvage FJ. Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science* 2009; 326: 572-574

Zhang J, Lipinski R, Shaw A, Gipp J, Bushman W. Lack of demonstrable autocrine hedgehog signaling in human prostate cancer cell lines. *J Urol* 2007; 177: 1179-1185

Zölliniger AM, 2008: Die Bedeutung der Akt-Kinase für die Viabilität der Tumorzellen und als therapeutischer Angriffspunkt im Multiplen Myelom.

[http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS\\_thesis\\_000000010715](http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000010715) (Zugriffsdatum: 24.03.2013)

## **8. Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Peter Brossart für die Bereitstellung des Themas und die abschließende Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Ein ganz herzlicher Dank gilt ebenso meinen Betreuerinnen Dr. rer. nat. Stefanie Held und Solveig Daecke für die wertvolle Unterstützung und die umfangreichen Hilfestellungen im Labor.

Nicht zuletzt danke ich jedoch meiner Familie, und hier insbesondere meiner Mutter Brigitte Limbach, für die aufmunternden Zusprüche bei Motivationstiefen und dafür, dass sie beim Schreiben der Arbeit immer ein offenes Ohr bei Problemen hatte.