

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik

Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Identifikation des HIV-Proteaseinhibitors Ritonavir
als Medikament mit potentieller Wirksamkeit
in der Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie
in Kombination mit Proteasominhibitoren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hendrik Müller-Ide
aus
Arnsberg

2012

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik

Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Identifikation des HIV-Proteaseinhibitors Ritonavir
als Medikament mit potentieller Wirksamkeit
in der Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie
in Kombination mit Proteasominhibitoren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hendrik Müller-Ide
aus
Arnsberg

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. Ch. Driessen

2. Berichtstatter: Professor Dr. H. Salih

- für Maïke -

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Leukämien	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie der Leukämien	1
1.1.2 Konventionelle Therapieoptionen bei der AML	4
1.1.3 Neue Therapieansätze bei der AML	5
1.2 Apoptose	7
1.2.1 Signalwege der Apoptose	8
1.2.1.1 Extrinsischer oder „Todesrezeptor“-Signalweg	8
1.2.1.2 Intrinsischer oder mitochondrialer Signalweg	9
1.2.1.3 Caspase-unabhängige Apoptose	11
1.2.2 Pathogenetische Relevanz der Apoptose	11
1.3 Das Proteasom	11
1.3.1 Aufbau des Proteasoms	12
1.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	13
1.5 Die pathogenetische Bedeutung des Proteasoms	15
1.6 Die Rolle des Endoplasm. Retikulums bei der Apoptose	16
1.6.1 <i>Unfolded Protein Response</i> (UPR) / ERAD	16
1.7 Proteasom- bzw. Proteaseinhibitoren	19
1.7.1 Bortezomib	19
1.7.2 Ritonavir	21
1.7.3 AdaAhx ₃ L ₃ VS (ALVS)	22
1.7.3.1 Aktivitätsmarkierung der Proteasomuntereinheiten (<i>Active Site Label</i>) in vivo mittels DansylAhx ₃ L ₃ VS (DALVS)	23
1.7.3.2 Aktivitätsmarkierung der Proteasomuntereinheiten (<i>Active Site Label</i>) mittels AdaK(bio)Ahx ₃ L ₃ VS (BioALVS)	23
1.7.4 NLVS	24

1.8 Histondeacetylaseinhibitoren	24
1.8.1 HDACi I	26
1.8.2 HDACi II	26
1.8.3 Valproinsäure / Natriumvalproat	27
1.9 Weitere antiproliferative Substanzen	28
1.9.1 Daunorubicin	28
1.9.2 Tunicamycin	29
1.10 Zielsetzung dieser Dissertation	30
2 MATERIAL UND METHODEN	31
2.1 Material	31
2.1.1 Zellen	31
2.1.2 Zellkulturmedium	31
2.1.3 Einfriermedium	32
2.1.4 Puffer, Lösungen, Chemikalien	32
2.1.5 Inhibitoren	35
2.1.6 Antikörper	37
2.2 Methoden	38
2.2.1 Isolierung von Patientenzellen	38
2.2.2 Zellkulturen	38
2.2.2.1 Kultivierung der Zellen	38
2.2.2.2 Kryokonservierung der Zellen	39
2.2.2.3 Tiefkühlung der Zellen	39
2.2.2.4 Wachstumskontrolle und Zellzahlbestimmung	40
2.2.3 Proliferationstest und dessen Auswertung	40
2.2.4 Erstellen einer BSA-Eichgerade	41
2.2.5 Lysierung der Zellen und Proteinbestimmung (modifiziert nach Bradford)	42
2.2.6 Aktivitätsmarkierung der Proteasomuntereinheiten (<i>Active Site Label</i>) / SDS-Gelelektrophorese	43
2.2.6.1 <i>Active Site Label</i> intakter Zellen mittels DALVS	43

2.2.6.2	<i>Active Site Label</i> lysierter Zellen mittels BioALVS	43
2.2.6.3	SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	44
2.2.6.4	Transfer und Blotting	44
2.2.6.5	Chemilumineszenz	45
3	ERGEBNISSE	47
3.1	Eichkurve	48
3.2	Einzelversuche zur Zellproliferation unter Bortezomib bzw. Ritonavir	49
3.2.1	Bortezomib	49
3.2.1.1	CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay zur Darstellung der antiproliferativen Wirkung von Bortezomib auf THP-1-Zellen	49
3.2.1.2	Darstellung der aktiven Proteasomuntereinheiten in lebenden THP-1-Zellen mittels DALVS	51
3.2.1.3	Darstellung der aktiven Proteasomuntereinheiten in lysierten THP-1-Zellen mittels BioALVS	52
3.2.1.4	Darstellung von Bortezomib-induziertem ER-Stress mittels Antikörpern	53
3.2.2	Ritonavir	54
3.2.2.1	CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay zur Darstellung der antiproliferativen Wirkung von Ritonavir auf THP-1-Zellen	54
3.2.2.2	Darstellung der aktiven Proteasomuntereinheiten in lebenden THP-1-Zellen mittels DALVS	56
3.2.2.3	Darstellung der aktiven Proteasomuntereinheiten in lysierten THP-1-Zellen mittels BioALVS	59
3.2.2.4	Darstellung von Ritonavir-induziertem ER-Stress mittels Antikörpern	59
3.3	Kombinationsversuche	61
3.3.1	Kombination von Ritonavir und Bortezomib	61

3.3.1.1	CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay zur Darstellung der antiproliferativen Wirkung von Ritonavir und Bortezomib auf THP-1-Zellen	62
3.3.1.2	Darstellung der aktiven Proteasomuntereinheiten in lebenden THP-1-Zellen mittels DALVS	64
3.3.1.3	Darstellung der aktiven Proteasomuntereinheiten in lysierten THP-1-Zellen mittels BioALVS	66
3.3.1.4	Darstellung von Bortezomib- und Ritonavir-induziertem ER-Stress mittels Anti-CHOP-Antikörper	68
3.3.1.5	CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay zur Darstellung der antiprolif. Wirkung von Ritonavir und Bortezomib auf primäre AML-Blasten von Patienten	68
3.3.1.5.1	Patient 1	69
3.3.1.5.2	Patient 2	70
3.3.1.5.2.1	Darstellung der aktiven Proteasomuntereinheiten in lebenden primären AML-Blasten von Patient 2 mittels DALVS	71
3.3.1.5.3	Patient 3	72
3.3.2	Kombinationsversuche zur THP-1-Zellproliferation unter der Kombination von Ritonavir mit anderen Inhibitoren	73
3.3.2.1	Ritonavir und Valproat	73
3.3.2.2	Ritonavir und HDACi I	75
3.3.2.3	Ritonavir und HDACi II	78
3.3.2.4	Ritonavir und Daunorubicin	79
3.3.3	Kombinationsversuche zur THP-1-Zellproliferation unter Kombination von Bortezomib mit anderen Inhibitoren	82
3.3.3.1	Bortezomib und Valproat	82
3.3.3.2	Bortezomib und HDACi I	83
3.3.3.3	Bortezomib und HDACi II	84
3.3.3.4	Bortezomib und Daunorubicin	85

4	DISKUSSION	88
4.1	Wahl der Methoden	88
4.2	Ergebnisse	90
4.2.1	Kombinationen mit Ritonavir	90
4.2.2	Kombinationen mit Bortezomib	93
4.3	Schlussfolgerung	94
5	ZUSAMMENFASSUNG	96
6	LITERATURVERZEICHNIS	98
7	DANKSAGUNG	112

1 EINLEITUNG

1.1 Die Leukämien

1.1.1 Definition und Epidemiologie der Leukämien

Der bereits 1845 von Rudolf Virchow geprägte Begriff „Leukämie“ („weißes Blut“) bezeichnet die diffuse Proliferation eines malignen Leukozytenklons. Diese ist durch eine Expansion im roten Knochenmark mit Verdrängung der physiologischen Hämatopoese und mitunter durch Infiltration extramedullärer Organe sowie Ausschwemmung leukämischer Zellen ins Blut gekennzeichnet – eine Leukozytose ist allerdings nicht obligat und bei der Akuten Myeloischen Leukämie beispielsweise nur in 50 % der Fälle vorhanden. Resultierende unspezifische Symptome sind erhöhte Blutungsneigung, Infektanfälligkeit und körperliche Schwäche aufgrund einer Anämie. Durch Organinfiltrationen und -vergrößerungen kann es zu lokalen Beschwerden und neurologischen bzw. Organausfällen kommen.^(48, 50)

Obwohl die akuten Leukämien mit weniger als 3 % eine kleine Fraktion unter allen Krebserkrankungen bilden, sind sie die Haupttodesursache bei onkologischen Patienten unter 35 Jahren.⁽¹⁰⁷⁾

Mit Ausnahme der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) nimmt die Inzidenz bei allen Formen mit steigendem Lebensalter zu, und es besteht eine deutliche Androtropie. Die akuten Leukämien unterscheiden sich von den chronischen nicht nur im Verlauf, sondern auch durch die enthemmte Proliferation unreifzelliger Blasten im Gegensatz zu reifen, zum Teil aber funktionslosen Zellklonen. Weiter unterteilt werden die Leukämien abhängig von dem entarteten Zelltypus in lymphatische und myeloische Formen. Die häufigste Leukämieform ist die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL, durchschnittliche Inzidenz 3,7 / 100.000 Einwohnern), welche zu den Non-Hodgkin-Lymphomen zählt. Die Inzidenz steigt bei über 80-Jährigen auf bis zu 31 / 100.000 an. Ihre Ursache ist unbekannt; eine familiäre Disposition erhöht das Erkrankungsrisiko allerdings um das Dreifache.^(48, 50, 107)

Die Akute Lymphatische Leukämie (durchschnittliche Inzidenz 1,4 / 100.000), auch „Lymphoblastenleukämie“ genannt, betrifft überwiegend Kleinkinder und

ist mit einem Anteil von über 90 % auch die dominierende Leukämieform bei diesen. Im Erwachsenenalter macht sie nur ca. 20 % der akuten Leukämiefälle aus. Auch hier sind die Ursachen zumeist unklar. Neben chemischen Noxen und ionisierender Strahlung spielen virale Infektionen (u.a. Retroviren) eine Rolle.

Die Chronische Myeloische Leukämie (CML) mit einer Inzidenz von 1,7 / 100.000 Einwohnern ist gekennzeichnet durch das in über 90 % der Fälle zu findende Philadelphia-Chromosom (t(9;22)), welches hier im Gegensatz zur der ALL, bei der es ebenfalls auftreten kann, einen günstigen Prognosefaktor darstellt. Die Ätiologie ist bis auf sehr hoch dosierte ionisierende Strahlung weitestgehend unbekannt. ^(48, 50, 107)

Die häufigste akute Form ist mit einem Anteil von 80 % die Akute Myeloische Leukämie (AML). Ihre durchschnittlichen Inzidenz beträgt 3,7 / 100.000 Einwohnern, steigt bei über 70-Jährigen allerdings auf etwa 20 / 100.000 an. Das mediane Erkrankungsalter beträgt 63 Jahre. ^(50, 107, 115)

Chromosomale Aberrationen, wie sie beim Down-Syndrom, Patau- oder Klinefelter-Syndrom vorliegen, begünstigen eine AML ebenso wie chemische Noxen (z.B. Benzol, Pestizide) und ionisierende Strahlung. Auch kann eine zytostatische Therapie mit Alkylanzien oder Topoisomerase-II-Inhibitoren wenige Jahre nach Exposition zu einer AML, oft mit nachweisbaren Chromosomenschäden, führen (therapieassoziierte Leukämie = t-AML). Des Weiteren kann sich eine Akute Myeloische Leukämie sekundär aus myeloproliferativen Erkrankungen, einem Myelodysplastischen Syndrom, einer aplastischen Anämie oder der Paroxysmalen Nächtlichen Hämoglobinurie entwickeln (Sekundärleukämie = s-AML). Beide sekundären Formen (t-AML, s-AML) sind therapieresistenter als die native Erkrankung.

Es finden sich jedoch lediglich bei 10 % der Erkrankten anamnestische Hinweise bezüglich der Ätiologie. ^(48, 50, 108)

Die gängige FAB-Klassifikation (French-American-British-Group) unterscheidet nach morphologischen und zytochemischen Kriterien acht Subtypen der AML, die neben der granulozytären Zellreihe auch undifferenzierte, monozytäre, erythrozytäre und megakaryozytäre Zellreihen beinhalten. Die Einteilung der

WHO berücksichtigt außerdem Chromosomenaberrationen, die in 50-60 % zu finden sind und prognostische Relevanz haben. So sind beispielsweise die Translokationen t(8;21) und t(15;17) sowie die Inversion inv(16) mit einer günstigeren Prognose verbunden.

Trotz eines im Allgemeinen kurativen Ansatzes der Therapie liegt die 5-Jahres-Überlebensrate auch bei jungen Patienten nur bei ca. 40 % und sinkt mit zunehmendem Erkrankungsalter. ^(48, 50, 107)

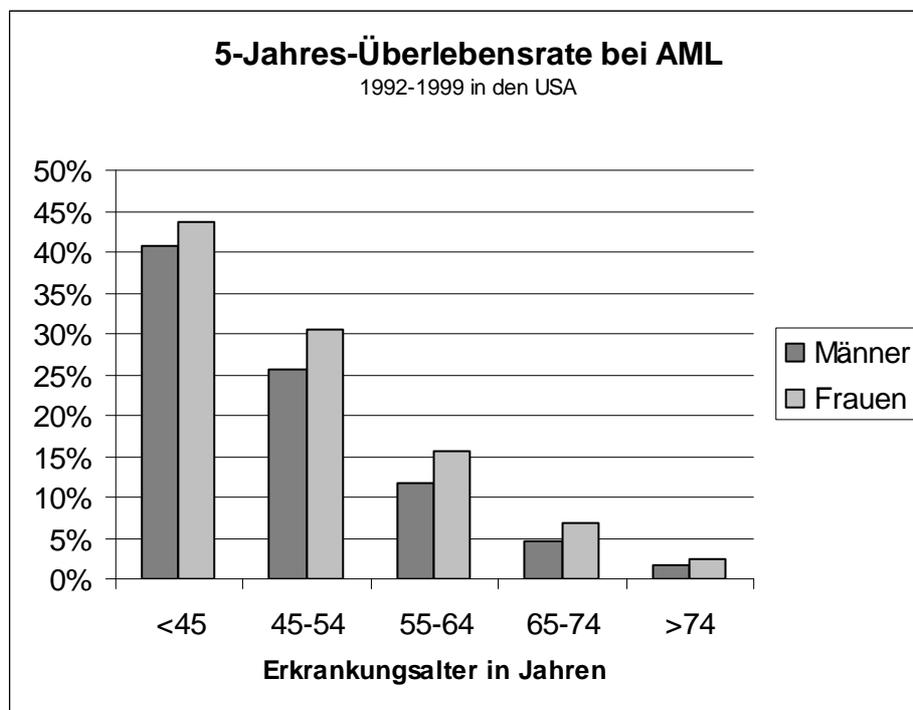


Abb. 1.1: 5-Jahres-Überlebensrate bei AML ⁽⁴⁸⁾

1.1.2 Konventionelle Therapieoptionen bei der AML

Die Therapie der AML wird im Allgemeinen unter Studienbedingungen durchgeführt und gliedert sich neben der supportiven Behandlung in Induktionstherapie, Konsolidierungstherapie und gegebenenfalls Erhaltungstherapie. Voraussetzung für eine Heilung bzw. ein Langzeitüberleben ist die hämatologische komplette Remission, welche das Ziel der Induktionstherapie darstellt. Definitionsgemäß bedeutet dies:

Keine Blasten im peripheren Blut, Regeneration der Hämatopoese mit Thrombozyten $> 100.000/\mu\text{l}$ und Neutrophilen $> 1.000/\mu\text{l}$, Blastenanteil im Knochenmark $< 5\%$, keine nachweisbare extramedulläre Manifestation sowie Fehlen einer transfusionsbedürftigen Anämie.

Die auch als Postremissionstherapie zusammengefassten Abschnitte Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie dienen der Aufrechterhaltung der kompletten Remission durch Elimination der MRD (*minimal residual disease*), also noch vorhandener, mikroskopisch aber nicht nachweisbarer Leukämiezellen. Ohne diese Therapie kommt es bei nahezu allen Patienten zu Rezidiven. Die dauerhafte Vollremission ist allerdings entscheidend für die Prognose und zudem Bedingung für eine allogene bzw. autologe Stammzelltransplantation, die bei rezidivierter AML praktisch die einzige Heilungschance bietet. ^(48, 50, 42)

Je nach Erkrankungsalter wird derzeit zwar von 45-75 % der Patienten eine vorübergehende Vollremission erreicht, doch sind Rezidive häufig:

Bei Standardrisikopatienten unter 60 Jahren beträgt die Rezidivrate 40-45 %, bei über 60-Jährigen liegt sie bei dem Doppelten – dazu kommt eine therapieassoziierte Mortalität von ca. 20 % in der Induktionsphase.

Die mediane Überlebenszeit beträgt zwei bis drei Jahre respektive acht bis zwölf Monate. ^(42, 108, 115, 56)

Tabelle 1.1: Beispiele von Therapieoptionen bei AML ^(48, 42)

Medikament	Wirkmechanismus	Anmerkung
Induktionstherapie		
<u>Cytarabin</u> (= ARA-C) + ein Anthrazyklin (<u>Daunorubicin</u> , <u>Idarubicin</u> , <u>Mitoxantron</u>) ggfs. zusätzlich <u>6-Thioguanin</u>	Pyrimidin-Antagonist; selektive Hemmung der DNA-abhängigen DNA-Polymerase	zwei Zyklen, komplette Remission: 65-75 % (Pat. < 60 J.) 45-55 % (Pat. > 60 J.)
	Interkalierung des DNA-Stranges, Hemmung der Topoisomerase	
	purinanaloger Antimetabolit	
ggfs. + Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor (GCS-F) (<u>Filgrastim</u> , <u>Pegfilgrastim</u>)	Zytokin	bei Neutropenie sowie zur Erhöhung der Chemotherapie- sensitivität von AML-Blasten
<u>All-trans Retinol</u> (ATRA) + <u>Idarubicin</u>	durch Bindung an Retinsäurerezeptor- α Ausdifferenzierung des leukämischen Zellklons	„AIDA“; bei Akuter Promyelozytenleukämie (APL = M3, t(15;17)), komplette Remission: > 90 %
	s. o.	
Konsolidierungstherapie		
<u>Cytarabin</u> , hochdosiert	s. o.	drei Zyklen
<u>Cytarabin</u> + <u>Daunorubicin</u>	s. o.	bei APL, zwei Zyklen
Erhaltungstherapie		
<u>All-trans Retinol</u> (ATRA) + <u>6-Mercaptopurin</u> + <u>Methotrexat</u> (MTX)	s. o.	nur bei APL, zwei Jahre lang
	purinanaloger Antimetabolit	
	Folsäureantagonist	

1.1.3 Neue Therapieansätze bei der AML

Aufgrund dieser insgesamt unbefriedigenden Therapieergebnisse, insbesondere bei älteren, oft chemoresistenten Patienten, besteht ein großer Bedarf an neuen bzw. ergänzenden Behandlungskonzepten. Die Evaluation pathophysiologischer Faktoren wie beispielsweise Chemokin- und Rezeptorstatus soll weitere Subklassifikationen und Risikoeinschätzungen der AML und damit individuellere Therapiestrategien möglich machen.

Aktuell befinden sich diverse Stoffe mit den unterschiedlichsten Wirkmechanismen in der Erforschung bzw. klinischen Erprobung (s. Tabelle 1.2). Dazu kommen Bestrebungen, durch modifizierte Protokolle Stammzelltransplantationen in ihrer Verträglichkeit und Einsatzmöglichkeit zu verbessern. ^(115, 121)

(115, 39, 120, 70, 73, 76, 2, 8, 118, 87, 121, 56, 80, 88, 32, 124, 44, 34)

Tabelle 1.2: Neue Therapieansätze bei der AML

Wirkstoffbeispiel	Wirkmechanismus	Anmerkung
<u>Verapamil</u> , <u>Ciclosporin A</u> , <u>Zosuquidar</u> , <u>PSC833</u> (Valspodar)	Hemmung des P-Glykoproteins (Zytostatikapumpe, vom MDR1 (<i>multi drug resistance</i>)-Gen kodiert)	sowohl bessere Remissions- und Überlebensraten bei Patienten mit erhöhtem P-Glykoprotein-Spiegel (bei Älteren Pat. z.T. höhere Expression) als auch Studienabbruch wg. erhöhter Mortalität (PSC833) beschrieben
<u>PKC412</u> (N-benzoyl-staurosporin), <u>SU5416</u>	Hemmung Leukämie-spezifischer Rezeptor-Tyrosinkinasen (FLT-3, VEGFR-2, c-KIT)	bei therapierefraktärer AML z. T. Erfolge
<u>Gemtuzumab-Ozogamizin</u> (GO)	CD33-Antikörper gekoppelt an das Antibiotikum Calicheamicin	bei rezidivierter CD33-positiver AML in 34 % (Pat. < 60 Jahre) bzw. 26% (> 60 Jahre) der Fälle Remission
<u>PTK787</u> , <u>Bevacizumab</u>	Hemmung des <i>Vascular Endothelial Growth Factors</i> (VEGF)	wachstumsfördernde Wirkung auf AML-Zellen und eventuelle Therapieresistenz durch VEGF soll gemindert sein
<u>G3139</u> (Oblimersen)	bindet als Antisense-Strang an bcl-2-mRNA	Steigerung der AML-Zell-Apoptose beschrieben
<u>5-aza-2'-deoxycytidin</u> (Decitabine, Dacogen)	Hemmung der DNA-Methyltransferase	soll DNA-Hypermethylierung bei AML (und MDS) verringern; Normalisierung des Karyotyps
Clofarabin	hemmt als Deoxyadenosin-Analogon die DNA- und Ribonukleotidreduktase-Synthese	aktuell zugelassen zur Drittlinientherapie der ALL bei Kindern, z.T. komplette Remission der AML im Rahmen klinischer Studien
Vorinostat	eine Hydroxamsäure, Histondeacetylaseinhibitor (siehe auch Kapitel 1.8)	zur Therapie der progredienten, refraktären Kutanen T-Zelllymphoms zugelassen, viel versprechende klinische Studien zur AML-Therapie
Lenalidomid	Immunmodulation, Antiangiogenese, Proliferationshemmung hämatopoetischer Tumorzellen	zugelassen zur Behandlung des Multiplen Myeloms (Kombination mit Dexamethason), klinische Studien zur AML-Therapie

1.2 Apoptose

Apoptose (griechisch απόπτωσης, *das Abfallen*), oft synonym mit "programmierter Zelltod" oder „Zell-Selbstmord“ verwendet, ist ein biochemischer und morphologischer Prozess, der hinsichtlich der Ontogenese, Homöostase und Integrität aller Metazoen essentiell ist. Auch immunologisch und in der Pathogenese vieler Erkrankungen spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle. Schon 1842 beobachtete Carl Vogt Zelluntergänge bei der normalen Entwicklung von Kröten. ⁽¹³⁰⁾

Doch erst in einer 1972 erschienenen Publikation über den Zelltod verschiedener Gewebe führten Kerr, Wyllie und Currie ⁽⁵⁹⁾ diese Bezeichnung in Anlehnung an das Fallen der Blätter im Herbst ein - auch die nicht mehr benötigten oder den Organismus gefährdenden Zellen lösen sich augenscheinlich freiwillig von ihrem Zellverband bzw. schnüren apoptotische Körper ab. Dabei handelt es sich allerdings um einen streng regulierten Vorgang, der auch heute nicht bis ins Detail geklärt ist. ^(20, 93, 127)

Genetisch determinierte Prozesse, beispielsweise während der Embryonalentwicklung, können eine Apoptose induzieren. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Ausdifferenzierung der Finger bzw. Zehen. Auch die Follikelatresie und die Menstruation im Rahmen des Ovarialzyklus sind auf Apoptose zurückzuführen. Auf exogene, zellschädigende Faktoren wie zum Beispiel ionisierende bzw. UV-Strahlung, Nährstoffmangel, oxidativen Stress, mechanische bzw. chemische Belastung oder Virusproteine reagiert die Zelle, abhängig von Art und Intensität der Schädigung, mit Reparaturmechanismen, Apoptose oder im Extremfall Nekrose. Somit ist die übliche Kategorisierung von Apoptose als „programmierter Zelltod“ und Nekrose als „provozierter Zelltod“ nicht ganz korrekt. Dennoch gibt es schon lichtmikroskopisch erkennbare Unterschiede: Die Nekrose betrifft ganze Zellverbände, es kommt zu einer osmotisch bedingten Schwellung, zytoplasmatischen Vakuolisierungen, Karyolyse, Karyorrhesis und schließlich einem Zerplatzen der Zellen mit konsekutiver lokaler Entzündungsreaktion. Bei der Apoptose hingegen sind auch einzelne Zellen betroffen, welche zunächst schrumpfen (daher die frühere Bezeichnung „Schrumpfnekrose“) - ihr Chromatin verdichtet sich (Pyknose)

und wird durch Endonukleasen zumeist in regelmäßige Abschnitte fragmentiert. Es kommt zu Bläschenbildungen an der Plasmamembran (*blebbing*) mit Ausbildung apoptotischer Körper und deren anschließender Phagozytose und lysosomaler Verdauung durch Nachbarzellen sowie Makrophagen und Dendritische Zellen. Durch deren Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie TGF- β und aufgrund bis zuletzt erhaltener Membranstabilität der apoptotischen Zellbestandteile kommt es zu keiner lokalen Entzündungsreaktion. ^(20, 93, 101, 31)

1.2.1 Signalwege der Apoptose

Auf molekularer Ebene sind es kaskadenartige biochemische Prozesse, durch welche die Apoptose induziert wird. Es können (mindestens) drei verschiedene Signalwege unterschieden werden: Der extrinsische oder „Todesrezeptor“-Signalweg, der intrinsische oder mitochondriale Signalweg sowie die Caspase-unabhängige Apoptose.

1.2.1.1 Extrinsischer oder „Todesrezeptor“-Signalweg

Die am besten untersuchten „Todesrezeptoren“ sind der TNFR-1 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1, auch p55 oder CD120a genannt) und der Fas-Rezeptor (auch Apo1 oder CD95). Beide sind integrale Membranproteine mit zytosolischen „Todesdomänen“ (DD, *death domains*), die nach Bindung ihrer spezifischen Liganden (TNF- α und TNF- β (Lymphotoxin) bzw. FasL) über das nichtenzymatische Adapterprotein Fadd (*Fas-associated protein with death domain*, auch Mort1) und seine *death effector domains* (DED) diejenigen der Initiatorcaspase Caspase-8 binden und mit ihr zusammen den *death inducing signalling complex* (DISC) bilden. ⁽⁷⁾

Caspasen sind Proteasen mit einem Cysteinrest in ihrem aktiven Zentrum, die Peptidbindungen C-terminal von Aspartat spalten (*cysteiny-l-aspartate-cleaving proteases*). Von ihnen existieren ca. 14 Varianten in menschlichen Zellen; sie sind praktisch ubiquitär zu finden und liegen als Zymogene (Pro-Caspasen) vor, die vermutlich selbst eine geringe Aktivität von 1 % haben. Caspasen können sich gegenseitig durch Dimerisierung und proteolytische Transprozessierung an einem Aspartatrest aktivieren. ⁽¹²⁾

Der entstandene DISC aktiviert nun weitere Caspasen - unter ihnen Caspase-3, die als Effektorcaspase schließlich über die Spaltung von Strukturproteinen und DNA-Degradation zum Zelltod führt. ⁽¹⁰¹⁾

Die apoptotische Wirkung von TNF wird allerdings von dem Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) limitiert. Dieser wird von TNF selbst aktiviert und induziert proinflammatorische sowie immunmodulierende Gene, während er die Apoptose hemmt. ⁽¹²³⁾

Eine Apoptoseinduktion durch TNF, wie oben beschrieben, findet offenbar überhaupt nur unter Blockade der Proteinbiosynthese statt, wofür wiederum NF- κ B mitverantwortlich zu sein scheint. ⁽¹⁰⁾

1.2.1.2 Intrinsischer oder mitochondrialer Signalweg

Intrazelluläre Kalziumüberladung, reaktive Sauerstoffspezies oder, bei Thrombozyten, IL-2-Deprivation können zu dieser Form der Apoptose führen. Sie ist gekennzeichnet durch die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c mittels proapoptotischer Bcl-2-Proteine wie *Bax*. Bei Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) handelt es sich um eine Proteinfamilie, welche durch die hochkonservierten Bcl-2-Gene kodiert wird. Ihre Produkte sind Proteine mit proapoptotischer (u.a. *Bax*, *Bak*, *Bok*, und *Bid*) oder antiapoptotischer Eigenschaft (das eigentliche Bcl-2 sowie *Bcl-XL*, *Mcl-1*, *Bfl-1*, *Bcl-W*). Sie befinden sich in der äußeren Mitochondrienmembran und beeinflussen sich durch wechselseitige Dimerisierung. Proapoptotische Bcl-2-Proteine wie *Bax* werden auch von dem Tumorsuppressorprotein p53 aktiviert (siehe unten).

Bcl-2-Proteine sind u.a. für die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilisation*, MOMP) verantwortlich, welche durch einen *permeability transition pore* (PTP) genannten und beide Membranen durchspannenden Kanal bestimmt wird. Öffnet sich dieser, tritt Cytochrom c aus und bindet an das zytosolische Protein *Apaf-1* (*apoptotic protease activating factor-1*). Zusammen mit dem energieliefernden dATP (Desoxyadenosintriphosphat) aggregieren diese zum Apoptosom und aktivieren die Initiatorcaspase Caspase-9. Diese wiederum aktiviert, analog zum extrinsischen Signalweg, Caspase-3.

Einen weiteren Beitrag zu dem Zelltod haben aus dem Mitochondrium ausgetretene Sauerstoffradikale und der Energieverlust aufgrund des Atmungskettenzusammenbruchs. (20, 101, 23, 17)

Nicht gänzlich geklärt ist der apoptoseinduzierende Mechanismus von Glukokortikoiden beispielsweise in Thymuszellen und, therapeutisch bei der ALL genutzt, in Lymphozyten. Apaf-1 und Caspase-9 sind maßgeblich beteiligt, offenbar jedoch unabhängig von Mitochondrien bzw. Cytochrom c. (24)

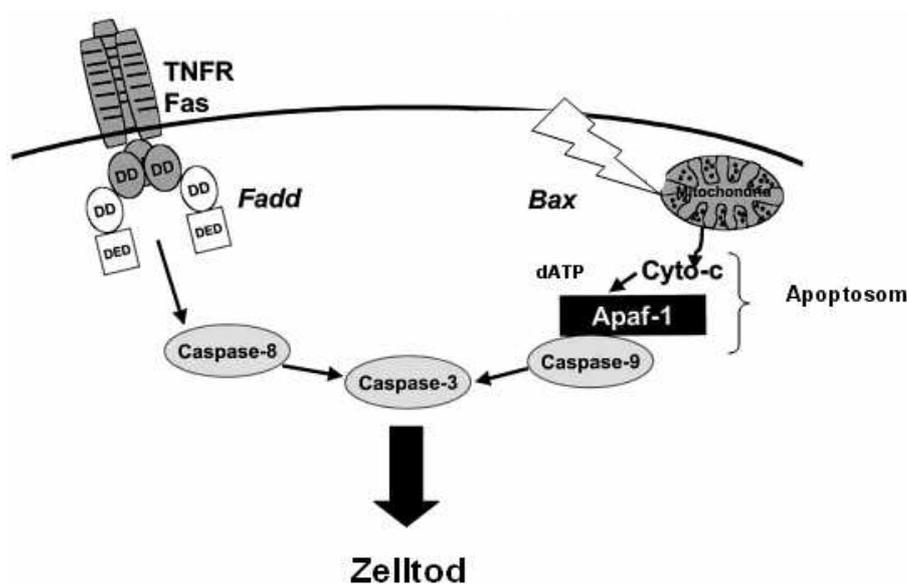


Abb. 1.2: Signalwege der Apoptose, modifiziert nach Reed JC, 2000 (101)

Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (= p55), „Todesdomänen“ (*death domains*), DED = *death effector domains*, Fadd = *Fas-associated protein with death domain*, Apaf-1 = *apoptotic protease activating factor 1*, dATP = *Desoxyadenosintriphosphat*, Cyto-c = *Cytochrom c*

1.2.1.3 Caspase-unabhängige Apoptose

Es existiert allerdings auch mindestens ein Caspase-unabhängiger Mechanismus, der zur Apoptose führt. In diesem spielt der Apoptoseinduzierende Faktor (AIF) im mitochondrialen Intermembranraum eine große Rolle. Dieser wird durch entsprechende Signale frei, wandert in den Zellkern ein, bindet DNA und führt schließlich zum Zelltod. ⁽¹⁰¹⁾

1.2.2 Pathogenetische Relevanz der Apoptose

Störungen der Apoptose haben eine große Bedeutung in der Pathogenese vieler Krankheiten. Neben neurodegenerativen Erkrankungen stehen auch solche wie Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, Autoimmunerkrankungen und AIDS in engem Zusammenhang mit vermehrter bzw. unerwünschter Apoptose. ⁽⁹⁹⁾

Andererseits führt eine verminderte Apoptose, etwa durch ein Überwiegen der Bcl-2-Aktivität oder einen Defekt des Tumorsuppressorgens TP53 (welches p53 kodiert), zu Zellakkumulationen wie bei onkologischen und anderen proliferativen Erkrankungen. Die an der Apoptose beteiligten Gene bzw. Proteine sind somit potentiell onkogen. Tatsächlich liegt in mehr als der Hälfte aller Malignome eine mutationsbedingte Inaktivität von p53 vor. Dieses Tumorsuppressorprotein beeinflusst das Zellwachstum, indem es entweder den Zellzyklus in der G1-Phase arretiert, wodurch DNA-Reparaturen ermöglicht bzw. unerwünschte Proliferation verhindert wird, oder über die Aktivierung proapoptotischer Bcl-2-Proteine eine Apoptose induziert.

Das autosomal-dominant vererbte Li-Fraumeni-Syndrom mit einer p53-Mutation und resultierenden Krebserkrankungen ist ein klassisches Beispiel für die Bedeutung dieses Tumorsuppressorgens. ^(7, 55, 100, 9)

1.3 Das Proteasom

Eine weitere bedeutende Rolle in der Regulation zellulärer Prozesse spielt das Proteasom. Bis Anfang der 1980er Jahre galten Lysosomen als verantwortlich für den Abbau extra- sowie intrazellulärer Proteine. Die lysosomalen Proteasen

sind allerdings unspezifisch und ihre Inhibition beeinflusst kaum den Abbau intrazellulärer Proteine, welche zudem spezifische Halbwertszeiten haben. ⁽¹⁰²⁾

Die Tatsache, dass die Proteolyse in Säugetierzellen außerdem ein ATP-verbrauchender Prozess ist, legte die Existenz eines anderen, spezifischeren Systems nahe. ⁽⁵¹⁾

Irwin A. Rose, Avram Hershko und Aaron Ciechanover erhielten im Jahr 2004 den Nobelpreis für Chemie für ihre Entdeckung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS), das sich als der Hauptabbauweg intrazellulärer eukaryotischer Proteine herausstellte. Es befindet sich im Zytoplasma und Zellkern, wo es den Proteinhaushalt der meisten zellulären Kompartimente reguliert. Neben dem Abbau fehlgefalteter bzw. defekter Proteine aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER, siehe unten) kommt ihm eine essentielle Stellung in Zellzyklus und -differenzierung, Stoffwechselwegen und beispielsweise der Regulierung von Membranrezeptoren zu. Die Vielfalt der proteasomalen Aufgaben macht hochspezifische Regulationsmechanismen notwendig, weshalb es sich hierbei auch um energiekonsumierende Vorgänge handelt. ⁽¹⁰²⁾

1.3.1 Aufbau des Proteasoms

Das eukaryotische Proteasom ist ein fassförmiger 26S-Proteinkomplex mit einer Molekülmasse von ca. 2 MDa, der aus zwei Untereinheiten besteht: Die zentrale 20S-Untereinheit (*core particle*, CP) setzt sich aus zwei äußeren und zwei inneren Ringen mit jeweils sieben weiteren Untereinheiten (α 1-7 bzw. β 1-7), also insgesamt 28 Untereinheiten mit einem jeweiligen Molekulargewicht von 21-31 kDa zusammen. Drei der β -Untereinheiten des so genannten konstitutiven Proteasoms beherbergen in ihrem tunnelförmigen Inneren die sechs katalytischen Zentren (jeweils zwei pro β 1-, β 2- und β 5-Untereinheit) mit Peptidylglutamylpeptidhydrolase-(Caspase-), Trypsin- respektive Chymotrypsin-ähnlichen Aktivitäten. ^(97, 26)

Diese Proteasomhydrolasen gehören zu der Familie der Threoninproteasen, da sich in jedem katalytischen Zentrum ein Threoninrest befindet. ⁽⁶¹⁾

Unter Einfluss von Zytokinen, insbesondere Interferon γ , bzw. mikrobieller Infektion werden hingegen β 1i-(LMP2)-, β 2i-(MECL1) und β 5i-(LMP7) -

Untereinheiten mit einem gegenüber den konstitutiven β -Einheiten verschiedenen Substratspektrum exprimiert. Die zu $\beta 1i$ und $\beta 5i$ gehörigen Gene befinden sich in der MHC-II-Region. Dieser Proteasomtyp wird folglich Immunproteasom genannt und ist für die Antigenprozessierung von Bedeutung. ^(3, 45, 109)

Die α -Untereinheiten der 20S-Proteasomuntereinheit stehen dagegen in Verbindung mit zwei aufsitzenden 19S-„Kappen“ (*regulatory particle*, RP), welche regulatorische Funktion haben, abzubauen Proteine erkennen und entfalten sowie deren Degradation induzieren.

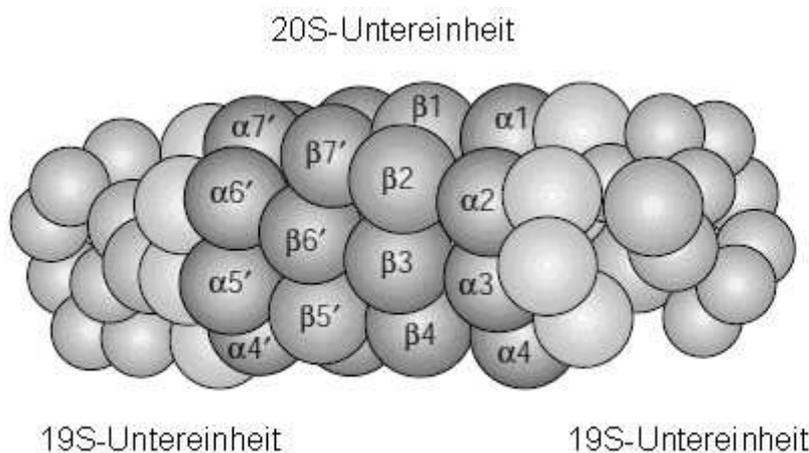


Abb. 1.3: Aufbau des 26S-Proteasoms, modifiziert nach Kloetzel PM, 2001 ⁽⁶²⁾

1.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Zum Abbau bestimmte Proteine müssen zunächst hierfür markiert werden. Dies geschieht durch eine Isopeptidbindung mit dem *ubiquitär* in kernhaltigen Zellen vorkommenden, hochkonservierten Polypeptid Ubiquitin (auch ATP-abhängiger Proteolysefaktor 1, APF-1, genannt).

Drei verschiedene Enzyme sind dafür zuständig: In einem ersten, ATP-verbrauchenden Schritt wird Ubiquitin durch das singuläre Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) adenyliert und anschließend zu dem in ca. 50 Variationen vorhandenen Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) transferiert. Dieses überträgt daraufhin das Ubiquitinmolekül mit seinem Glycinrest auf eine

Lysinseitenkette des an einer spezifischen Ubiquitin-Ligase (E3, ca. 1.000 Varianten) gebundenen Substrats. Durch Wiederholung dieser Schritte entsteht schließlich ein poly-ubiquitinyliertes Protein, welches bereit für den proteasomalen Abbau ist. ^(102, 41, 46)

Dieser Vorgang ist reversibel – Deubiquitinylierungsenzyme (vorwiegend Cysteinproteasen) können das Ubiquitin wieder von den jeweiligen Proteinen abtrennen.

Nach Einschleusung ins Innere der 20S-Untereinheit und dort stattgefundener Hydrolyse werden die entstandenen Peptide durch zytosolische Proteasen weiter zu Aminosäuren abgebaut, während die durch die 19S-Untereinheit abgespaltenen Ubiquitinmoleküle reutilisiert werden. ⁽¹⁰²⁾

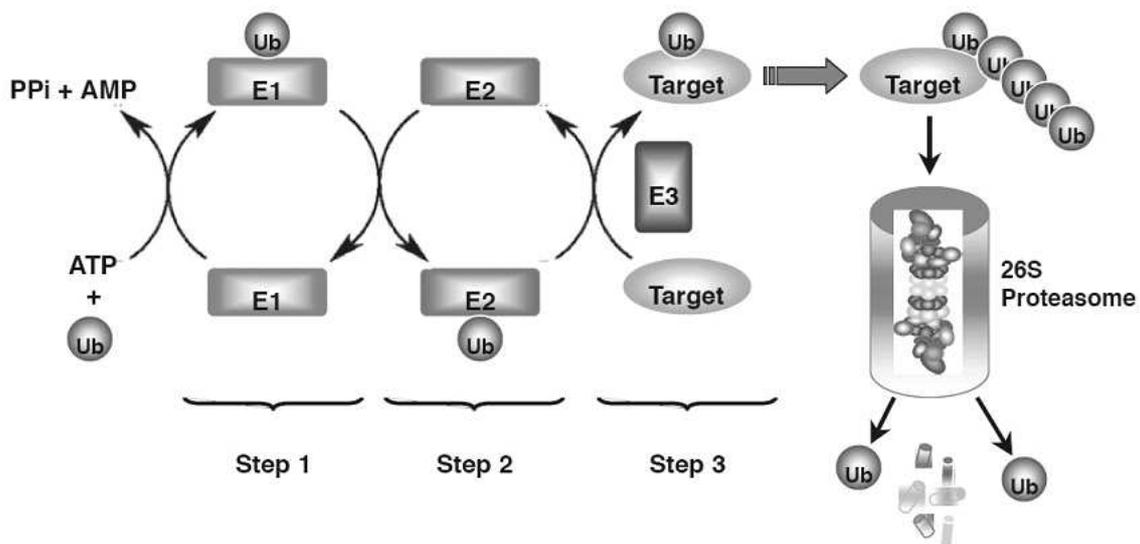


Abb. 1.4: Das Ubiquitin-Proteasom-System im Überblick, Wang J et al. 2006 ⁽¹³²⁾

PPi = Pyrophosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, ATP = Adenosintriphosphat,
 Ub = Ubiquitin, E1 = Ubiquitin-aktivierendes Enzym, E2= Ubiquitin-konjugierendes Enzym,
 spezifische Ubiquitin-Ligase, Target = abzubauenendes Substrat

Zum Teil ist das Proteasom allerdings auch bei der Prozessierung von Präkursorproteinen beteiligt und entlässt dann biologisch aktive Peptide, wie z.B. die P50-Untereinheit des schon erwähnten antiapoptotischen Transkriptionsfaktors NF-κB (Heterodimer aus p50 und p65). ⁽⁹⁸⁾

Auch dessen normalerweise an ihn gebundener Inhibitor I κ B wird durch das Proteasom degradiert, was folglich einen weiteren Beitrag zur NF- κ B-Aktivierung leistet. ⁽¹⁰³⁾

Ferner werden p27 und p21 (WAF1/CIP1), Cyclin-abhängige-Kinasen-Inhibitoren, abgebaut. Diese Proteine führen zu einer Stagnation des Zellzyklus in der G1- bis S-Phase. ^(5, 1)

Daneben ist das Ubiquitin-Proteasom-System eng mit regulativen Vorgängen und der Apoptose verknüpft: Störungen in diesem System, ob im Sinne einer Hemmung oder einer gesteigerten Aktivität, können ebenso fatale Konsequenzen für den gesamten Organismus haben wie Störungen bei der Apoptose selbst. Mitunter bedingen sie auch die Apoptose, wie im Falle von NF- κ B oder p53 (siehe unten).

1.5 Die pathogenetische Bedeutung des Proteasoms

Beispiele für pathogenetische Beteiligungen des Proteasoms sind zahlreich und nehmen bei steigendem Interesse dieses Forschungsgebietes stetig zu. Genannt seien neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Stoffwechselstörungen wie Mukoviszidose oder Erbkrankheiten wie das Angelman-Syndrom. ⁽¹⁰²⁾

Auch bei Virusinfektionen spielt das Ubiquitin-Proteasom-System eine Rolle, da virale Proteine durch das Proteasom im Zytoplasma zu Peptiden prozessiert werden, die dann im Komplex mit MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche von antigenspezifischen T-Zellen erkannt werden, welche daraufhin die spezifische antivirale Immunantwort steuern. ⁽³⁶⁾

Nicht zuletzt sind es aber onkologische Erkrankungen, die durch Beeinflussung des Proteasoms bzw. seiner Substrate entstehen können. Dem Tumorsuppressorprotein p53 kommt hier eine besondere Bedeutung zu, da sein kodierendes Gen TP53 nicht nur wie oben beschrieben mutationsbedingt inaktiv, sondern auch einem gesteigerten Abbau im Proteasom unterworfen sein kann. So ist der Spiegel von p53 in einigen Tumorzellen signifikant erniedrigt, ohne dass eine Mutation vorliegt. ⁽¹³³⁾

Das für dessen Degradation verantwortliche spezifische Enzym E3 wird MDM2 genannt (kodiert durch das Onkogen MDM2, *murine double minute Gen 2*) und ist in diesem Fall aktiviert (wie auch in manchen AML-Zellen⁽⁶³⁾) oder wird durch eine virale Variante ersetzt, wie bei *high-risk* HPV-positiven Zervixkarzinomen. Somit entgeht die maligne Zelle der p53-induzierten Apoptose.^(116, 16)

1.6 Die Rolle des Endoplasmatischen Retikulums bei der Apoptose

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein für die Protein- und Lipidsynthese sowie deren Modifikation verantwortliches zytoplasmatisches Organell. Membranproteine und sekretorische Proteine werden hier gefaltet und an die Zelloberfläche, den Golgiapparat respektive in Lysosomen transportiert. Chaperone wie BiP/GRP78 (*Binding Immunoglobulin Protein/Glucose-Regulated Protein*, ein Hitzeschockprotein), PDI (Protein Disulfid Isomerase), andere Hitzeschockproteine (z.B. Hsp 40, 70, 90) und Calreticulin unterstützen die korrekte Proteinfaltung. Fehlgefaltete Proteine dagegen werden zunächst im ER zurückgehalten. Die Akkumulation von fehlerhaften Proteinen erzeugt ER-Stress.⁽⁵⁷⁾ Diesem wird von Seiten des Endoplasmatischen Retikulums mit im Folgenden beschriebenen Mechanismen begegnet.

1.6.1 *Unfolded Protein Response (UPR) / ERAD*

Die *Unfolded Protein Response* (UPR) beinhaltet, einhergehend mit einer verminderten Eiweißsynthese, eine vermehrte Chaperon-Rekrutierung sowie die verstärkte proteasomale Degradation schadhafter Proteine. Das Proteasom ist somit Teil des ERAD-Systems (*ER-Associated Degradation*).^(77, 83)

Die Signalwege dreier Transmembranproteine des ER sind Bestandteil des UPR: ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*), IRE1 (*Inositol Requirement 1*) und PERK (*Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase*).

Diese Transmembranproteine werden normalerweise an ihrem luminalem N-Terminus durch BiP gebunden und dadurch inaktiviert.

Im Falle von ER-Stress löst sich BiP und bindet in seiner Funktion als Chaperone an die ungefalteten Proteine. ATF6, IRE1 und PERK sind somit aktiviert:

Das nach Spaltung im Golgiapparat zum Transkriptionsfaktor gereifte ATF6 fördert die Transkription von XBP1 (*X-Box Binding Protein 1*), CHOP (s.u.) sowie Chaperonen.

Die Serin-Threonin-Kinase und Endoribonuklease IRE1 aktiviert XBP1 durch mRNA-Splicing zu dem Transkriptionsfaktoren bZIP (*Basic Leucine Zipper*), welcher wiederum die Expression von Chaperonen fördert. ⁽¹⁴⁾

PERK initiiert die Phosphorylierung von eIF-2 (*Eukaryotic Initiation Factor-2*), wodurch die Proteinsynthese des ER auf Translationsebene unterdrückt wird sowie der Zellzyklus in der G1-Phase persistiert. Des Weiteren wird durch PERK der Transkriptionsfaktor NF-κB aktiviert, wodurch zunächst der Apoptose entgegengewirkt wird. ^(137, 117, 33)

Somit stellen die oben beschriebenen Signalwege Mechanismen zum Schutz des ER und der gesamten Zelle dar (fett gedruckte Pfeile in Abb.1.5).

Exzessiver ER-Stress führt hingegen im Sinne einer „*Overwhelming UPR*“ zur Apoptose (hell gedruckte Pfeile in Abb.1.5). Die Phosphorylierung von eIF-2 durch PERK nimmt dabei auf Kosten der Aktivierung des antiapoptotischen NF-κB zu.

Die Signalwege CHOP (*C/EBP Homologous Protein*, auch GADD153 (*Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Gene 153* genannt)), JNK (c-Jun N-terminale Kinasen) und Caspase-4 (homolog der murinen Caspase-12) sind an der Apoptoseinduktion beteiligt: ^(89, 33)

CHOP hemmt die oben beschriebenen antiapoptotischen Proteine Bcl-2 and Bcl-X und fördert den proapoptotischen Effekt des *BH3-only* (*Bcl-2-homology domain 3 only*) Proteins Bim (*Bcl-2 Interacting Mediator of Cell Death*) im Mitochondrium.

IRE1 aktiviert über eine Rekrutierung von JIK (*c-Jun-N-terminal Inhibitory Kinase*) und TRAF2 (*TNF Receptor-Associated Factor 2*) unter anderem JNK, wodurch es über Apaf-1, Caspase-9 und Caspase-3 zur Apoptose kommt.

Über IRE1 und TRAF2 wird darüber hinaus (spezifisch unter ER-Stress) die Caspase-4 (in Mäusen entsprechend Caspase-12) aktiviert, welche wiederum über die Caspasen 9 und 3 die Apoptose induziert (siehe Abb.1.5). (139, 96, 92)

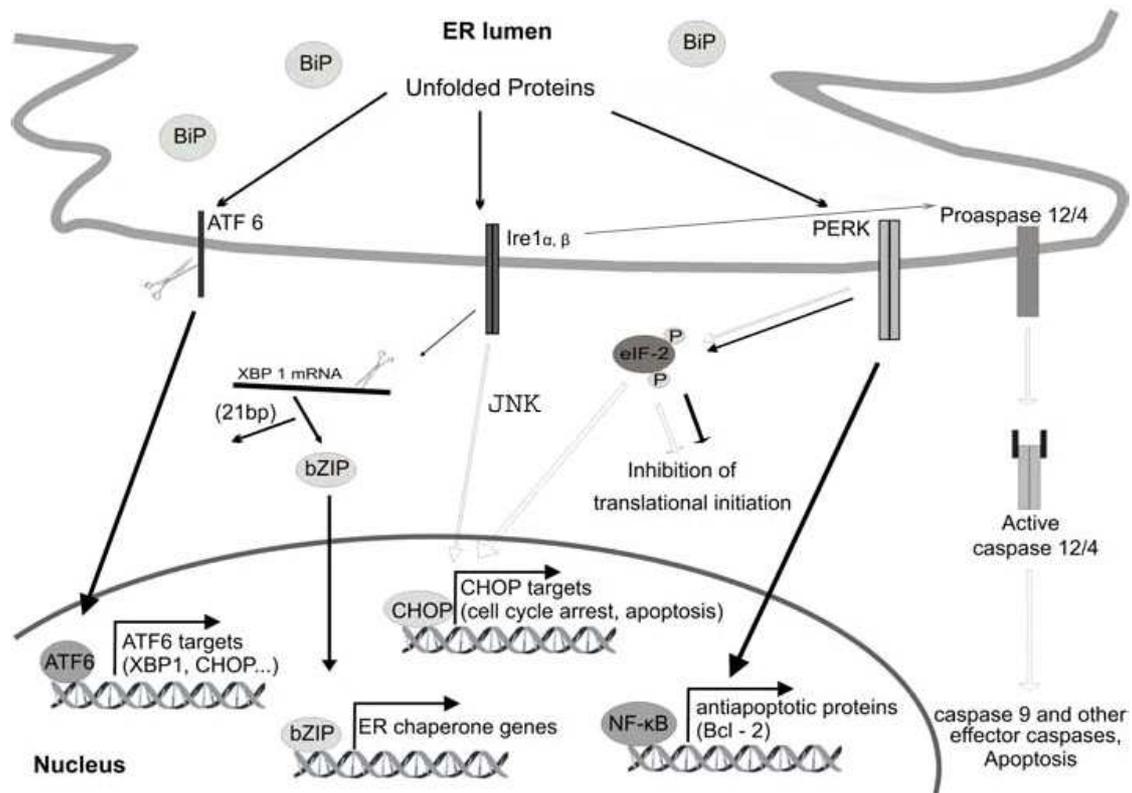


Abb.1.5: UPR-Signalwege, modifiziert nach Faitova J et al. 2006 ⁽³³⁾

ER = Endoplasmatisches Retikulum, BiP = *Binding Immunoglobulin Protein*,
 ATF6 = *Activating Transcription Factor 6*, XBP1 = *X-Box Binding Protein 1*,
 CHOP = *C/EBP Homologous Protein*, bZIP = *Basic Leucine Zipper*,
 IRE1 = *Inositol Requirement 1*, JNK = *c-Jun N-terminale Kinasen*,
 eIF-2 = *Eukaryotic Initiation Factor 2*, P = Phosphat,
 PERK = *Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase*,
 NF- κ B = *Nuclear Factor- κ B*, Bcl-2 = *B-cell lymphoma 2*

1.7 Proteasom- bzw. Proteaseinhibitoren

1.7.1 Bortezomib

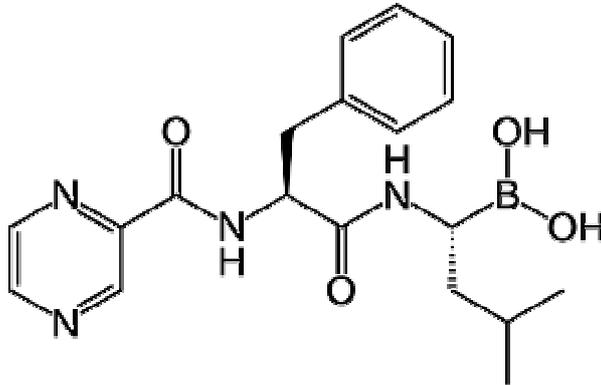


Abb. 1.6: Strukturformel von Bortezomib ($C_{19}H_{25}BN_4O_4$) ⁽¹²⁸⁾

Erster Vertreter der neuen Medikamentenklasse der *Proteasominhibitoren* ist Bortezomib (Velcade[®]). Dieses Boronsäuredipeptid, früher PS-341 genannt, hemmt selektiv und kompetitiv (somit reversibel) die 20S-Untereinheit des Proteasoms am Chymotrypsin-ähnlichen aktiven Zentrum (β 5-Untereinheit) sowie am Peptidylglutamylopeptidhydrolase-ähnlichen aktiven Zentrum (β 1-Untereinheit). ^(104, 97)

Es ist mehr als 1.500-fach selektiver für das Proteasom als für das Enzym mit der nächst niedrigeren Affinität. ⁽²⁸⁾

Folgende Apoptosemechanismen der malignen Zielzellen werden durch Bortezomib induziert: ^(52, 53, 91, 71)

- Inaktivierung von NF- κ B (Hemmung des Zellwachstums durch verminderte Cyclin-D- und IL-6-Transkription; Veränderung der Adhäsionsmolekül-Expression; Unterdrückung von Chemotherapie-Resistenzmechanismen, verminderte Angiogenese)
- Downregulation von gp130 (signaltransduzierende Untereinheit des IL-6-Rezeptors)
- Induktion von p53, MDM2-Expression

- Aktivierung der JNK (Aktivierung der Caspase-8 und Caspase-3)
- Mitochondrialer Cytochrom c-Austritt und Caspase-9-Aktivierung
- Aktivierung der Caspase-4 mit konsekutivem ER-Stress
- Inhibition der Endoribonuklease IRE1, somit fehlendes XBP1-mRNA-Splicing und folglich Hemmung der zunächst zellschützenden UPR

Im Jahre 2003 in den USA (in Deutschland 2004) zunächst nur für die „Third-Line“-Therapie rezidivierter, progredienter Multipler Myelome, mittlerweile auch als „Erstlinien“-Therapeutikum zugelassen ^(28, 104, 103), erhielt es Anfang 2007 auch die Zulassung zur Rezidiv-Therapie von Patienten mit Mantelzell-Lymphomen. ⁽³⁵⁾

In einer Phase-III-Studie war Bortezomib beispielsweise einer hochdosierten Dexamethasontherapie bezüglich Ansprechrate, progressionsfreier Zeit und Überleben bei rezidiviertem Multiplen Myelom überlegen. ⁽¹⁰⁴⁾

Bei den Mantelzell-Lymphomen ließ sich ebenfalls ein signifikant positiver Effekt zeigen. ⁽³⁵⁾

Des Weiteren wird Bortezomib hinsichtlich seiner Wirksamkeit gegen zahlreiche andere Tumorerkrankungen getestet. ^(69, 43, 78, 94, 64)

Bortezomib wird überwiegend in einer Anfangsdosis von 1,3 mg/m² Körperoberfläche zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von zwei Wochen (Tage 1, 4, 8 und 11) als intravenöser Bolus verabreicht. Es folgt eine 10-tägige Therapiepause (Tage 12-21). Dieser dreiwöchige Zeitraum stellt einen Behandlungszyklus dar. ⁽²⁸⁾

Hierbei wird ein Plasmaspiegel von 10-20 nM Bortezomib erreicht. ⁽⁶⁶⁾

Nebenwirkungen dieses Medikaments äußern sich unter anderem in Form gastrointestinaler Beschwerden, Infektionen wie Herpes zoster und Atemwegsinfekten, Fatigue, peripherer Neuropathie und Blutbildveränderungen infolge Myelosuppression.

1.7.2 Ritonavir

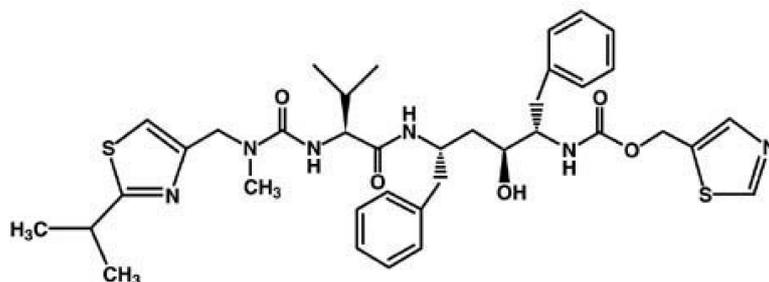


Abb. 1.7: Strukturformel von Ritonavir ($C_{37}H_{48}N_6O_5S_2$) ⁽¹¹¹⁾

Der Proteaseinhibitor Ritonavir (Norvir[®]) ist schon seit 1996 in der HIV-Therapie zugelassen. Als Komponente der HAART (*highly active anti-retroviral therapy*) unterstützt er die Wirkung der Kombinationspartner (Nukleosidische oder Nichtnukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren), indem er die HIV-1- und HIV-2-Aspartylproteasen hemmt. Hierdurch wird peptidomimetisch eine enzymatische Verarbeitung des viralen gag-pol-Polypeptids verhindert, wodurch unreife und nicht-infektiöse HIV-Viruspartikel produziert werden.

Ritonavir inhibiert in geringem Umfang auch die menschlichen Aspartylproteasen. ⁽²⁷⁾

Aufgrund einer ausgeprägten Hemmung unter anderem der Cytochrom-P450-Isoformen CYP3A und (geringer) CYP2D6 werden eine Vielzahl von Arzneimittelinteraktionen beschrieben. Therapeutisch genutzt wird dies in Form der Kombination von Ritonavir mit anderen HIV-Proteaseinhibitoren wie Lopinavir, Indinavir oder Saquinavir, da hierdurch die jeweiligen Plasmakonzentrationen erhöht werden. ⁽¹¹⁰⁾

Es wurde zudem ein proteasominhibierender Effekt postuliert ⁽⁶⁾ - darüber hinaus wurde bei HIV-positiven Patienten mit Kaposi-Sarkom eine Tumorregression unter Ritonavirtherapie beschrieben. ⁽²¹⁾

Diese Tatsachen machten Ritonavir, alleine und in Kombination mit Proteasominhibitoren bzw. anderen Wirkstoffen, für Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung auf AML-Zellen interessant, zumal es als bereits zugelassenes Medikament für einen klinischen Einsatz in kontrollierten Studien,

oder auch als *off label-* bzw. *compassionate use*-Medikament bereits zur Verfügung steht. ⁽³⁷⁾

Die zugelassene Standarddosierung beträgt zweimal 600 mg Ritonavir pro Tag, wobei die klinisch dabei erreichten Plasmaspiegel zwischen 10 und maximal 30 μM liegen.

Häufige und sehr häufige unerwünschte Wirkungen unter einer Ritonavirtherapie sind u.a. gastrointestinale Beschwerden, Kopfschmerzen, Fieber, Gewichtsverlust, Transaminasenerhöhung, CK-(Creatinkinase)-Erhöhung sowie unspezifische Blutbildveränderungen. Fettstoffwechselstörungen wie Hypertriglyceridämie und Hypercholesterinämie und das vermehrte Auftreten von Atherosklerose unter Ritonavireinnahme werden auf die Induktion von ER-Stress und Apoptose von Hepatozyten sowie Makrophagen zurückgeführt. ⁽¹⁴⁰⁾

1.7.3 AdaAhx₃L₃VS (ALVS)

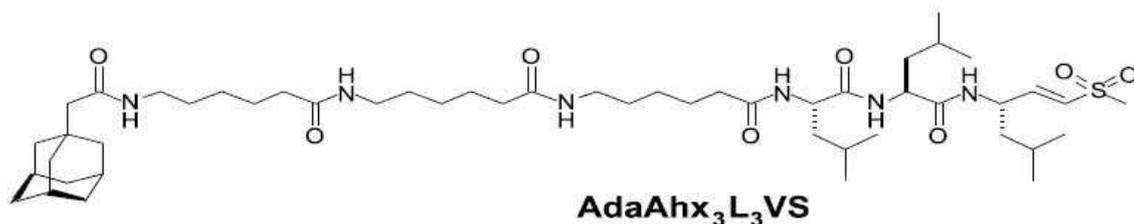


Abb. 1.8: Strukturformel von AdaAhx₃L₃VS ⁽⁶⁰⁾

Bei dem Vinylsulfon AdaAhx₃L₃VS (ALVS, Adamantan-Acetyl-1-Amino-6-Hexanoyl-Carboxy-Benzyl-Leucyl-Leucyl-Leucin-Vinylsulfon) handelt es sich um einen neu entwickelten Proteasominhibitor, welcher die „Trypsin-ähnliche“, die „Chymotrypsin-ähnliche“ sowie die Peptidylglutamylpeptidhydrolase-Aktivität des konstitutiven und Immunoproteasoms irreversibel hemmt. ⁽⁶⁰⁾

Adamantanylacetat am N-Terminus der Verbindung gewährleistet die Zellpermeabilität, während 6-Aminohexansäure (Ahx) als *Spacer* dient. Dieser Proteasominhibitor hat eine höhere, hinsichtlich der Untereinheiten unspezifischere Aktivität als das weiter unten beschriebene Vinylsulfon NLVS.

1.7.3.1 Aktivitätsmarkierung der Proteasomuntereinheiten (*Active Site Label*) in vivo mittels DansylAhx₃L₃VS (DALVS)

Der mithilfe eines N-terminal an AdaAhx₃L₃VS angefügten Dansylsulfonamido-hexanoyl-Haptens zellpermeable Proteasominhibitor DansylAhx₃L₃VS (oder DALVS) wurde in meinen Versuchen zur Aktivitätsmarkierung (*Active Site Labelling*) der katalytischen Proteasomuntereinheiten verwendet (zur Durchführung siehe Kapitel 2, „Material und Methoden“). Die Zellpermeabilität ermöglicht erstmals eine Aktivitätsmarkierung des Proteasoms in lebenden Zellen, welche mittels Anti-Dansyl Western Blot dargestellt werden kann.

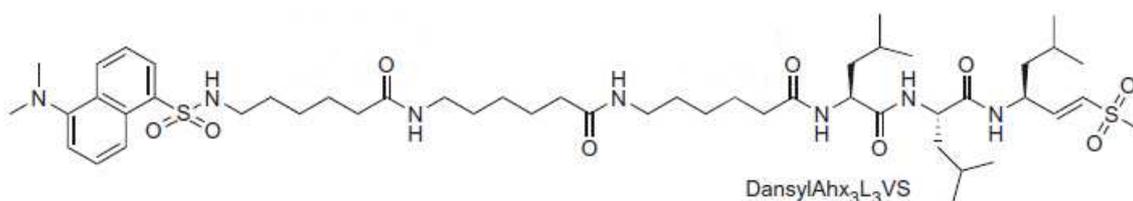


Abb. 1.9: Strukturformel von DansylAhx₃L₃VS (DALVS) ^(11, 60)

1.7.3.2 Aktivitätsmarkierung der Proteasomuntereinheiten (*Active Site Label*) mittels AdaK(bio)Ahx₃L₃VS (BioALVS)

Ein weiteres in meiner Arbeit zum Einsatz gekommenes Vinylsulfon zur Darstellung der Aktivität der katalytischen Proteasomuntereinheiten ist AdaK(bio)Ahx₃L₃VS (BioALVS). Hierbei handelt es sich um biotinyliertes AdaAhx₃L₃VS (ϵ -Biotinyl-Lysin „K(bio)“ nahe des N-Terminus), dessen Biotinanteil das aktive Zentrum der Proteasomuntereinheiten bindet, was per Chemolumineszenz mittels fluoreszenzmarkiertem Streptavidin dargestellt werden kann (siehe Kapitel 2, „Material und Methoden“). Nachteil dieser Methode gegenüber DansylAhx₃L₃VS ist die fehlende Zellpermeabilität, so dass keine Möglichkeit der Aktivitätsmarkierung in intakten Zellen besteht sondern mit lysierten Zellen gearbeitet werden muss. ⁽¹²⁹⁾

1.7.4 NLVS

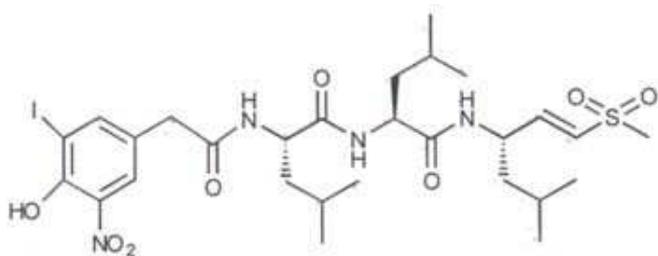


Abb. 1.11: Strukturformel von NLVS ⁽⁸⁶⁾

Der Proteasominhibitor NLVS (NIP [4-Hydroxyl-5-Iodo-3-Nitrophenylacetat] - Leucyl-Leucyl-Leucin-Vinylsulfon), ein weiteres Vinylsulfon, hemmt ebenfalls irreversibel die „Chymotrypsin-ähnliche“ und (allerdings weniger ausgeprägt) die „Trypsin-ähnliche“ sowie die Peptidylglutamylpeptidhydrolase-Aktivität des Proteasoms durch kovalente Modifikation des Threoninrestes der katalytischen β -Untereinheit des Proteasoms. ⁽⁹⁰⁾

1.8 Histondeacetylaseinhibitoren

Histone sind nukleäre Proteine, welche in eukaryoten Zellen zusammen mit der um sie gewickelten DNA die Nukleosomen bilden. Neben der strukturellen Funktion im Sinne einer Verpackung der DNA haben die Histone eine wichtige epigenetische Aufgabe:

Die enzymatische Modifikation der aus den Nukleosomen herausragenden endständigen Polypeptidanteile etwa in Form von Acetylierung, Methylierung, Ubiquitylierung oder Phosphorylierung beeinflusst die Transkription von Genen der zu dem jeweiligen Nukleosom gehörigen DNA, wie V.G. Allfrey schon 1977 nahe legte. ⁽⁴⁾

Der Acetylierungsstatus der Histone wird durch das Zusammenspiel der Enzymklassen Histonacetyltransferasen (HAT, multiple Proteine mit entsprechender enzymatischer Aktivität) und Histondeacetylasen (HDAC, 11 Isoenzyme in vier Klassen) bestimmt. ⁽²⁵⁾ Veränderte Aktivitäten dieser Enzyme sind mit dem Auftreten von Tumorerkrankungen assoziiert. Beispiele hierfür sind die Akute Promyelozytenleukämie oder auch die Akute Myeloische Leukämie (M2). ^(131, 75)

Substrate der HAT bzw. HDAC sind unter anderem die ϵ -Aminogruppen der Lysinreste am N-Terminus der Histone. Die Deacetylierung dieser Lysinreste bewirkt durch ihre Positivierung eine feste Bindung der Histone an das negativ geladene Phosphat-Rückgrat (*Backbone*) der DNA, was zu einer Inaktivierung der Gentranskription führt.

Die HDACs nehmen auch über eine direkte Deacetylierung von Transkriptionsfaktoren wie p53 oder NF- κ B Einfluss auf die Genexpression und spielen bei der Regulation des Zellzyklus eine Rolle. ^(47, 49)

Eine Acetylierung hingegen neutralisiert die Ladung der Histone und gewährt Transkriptionsfaktoren Zugriff auf die DNA. ⁽⁸¹⁾

Darüber hinaus beherbergen HATs Acetyl-Lysin-Bindungsdomänen (Bromodomänen), über welche spezifische Protein-Protein-Interaktionen reguliert werden können. ⁽¹³⁸⁾ Somit kann durch Inhibierung der Histondeacetylasen (also Hyperacetylierung) beispielsweise die epigenetische Abschaltung (*Silencing*) von APAF-1, Caspase-8 und anderen Proteinen unterdrückt und entsprechend ein Wachstumsstillstand, die Differenzierung oder auch Apoptose transformierter Zellen bewirkt werden (s. Abb. 1.12). ^(79, 81)

Ein bereits etablierter Histondeacetylaseinhibitor ist Vorinostat, welches zur Therapie des kutanen T-Zelllymphoms zugelassen ist und in klinischen Studien auch einen inhibierenden Effekt auf AML-Zellen gezeigt hat. ⁽³⁸⁾

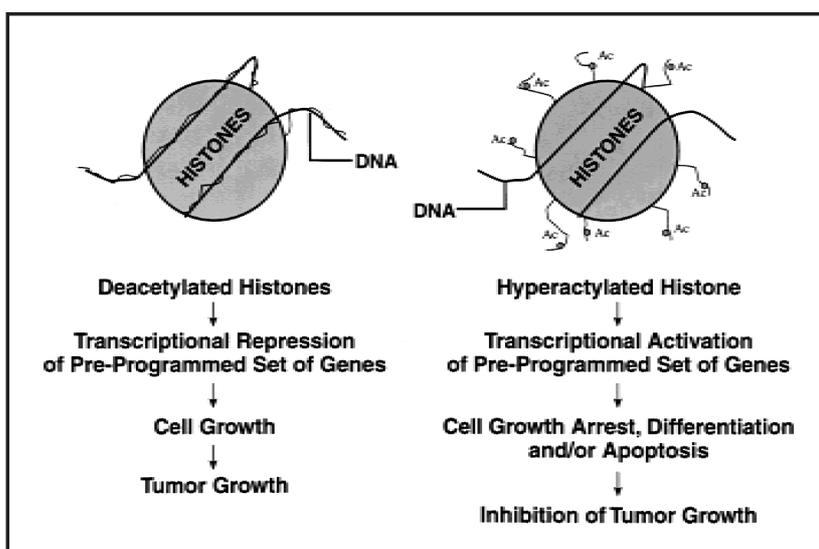


Abb. 1.12: Modell zur Rolle der Histone bei Induktion / Inhibition von Tumorwachstum ⁽⁸¹⁾

1.8.1 HDACi I

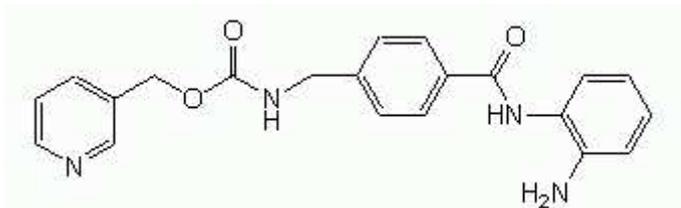


Abb. 1.13: Strukturformel von HDACi I ($C_{21}H_{20}N_4O_3$)⁽⁸⁴⁾

Der Histondeacetylaseinhibitor HDACi I (oder auch M-(27)-275 / Entinostat / SNDX-275) ist ein zellpermeables Benzamid-Analogon und führt mittels Histonhyperacetylierung zu einer quantitativen Abnahme der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus zugunsten derjenigen in der G1-Phase und induziert die Tumorsuppressoren p21 (WAF1/CIP1) und Gelsolin, wobei letzterer nur in vivo Effektivität gezeigt hat.^(112, 122)

Des Weiteren induziert HDACi I die Zelldifferenzierung sowie die Transkription des TGF- β II-Rezeptoren (T β RII).⁽⁸⁴⁾

HDACi I inhibiert das Isoenzym HDAC 1 stärker als HDAC 3. HDAC 8 wird hingegen nicht inhibiert.⁽¹⁵⁾

1.8.2 HDACi II

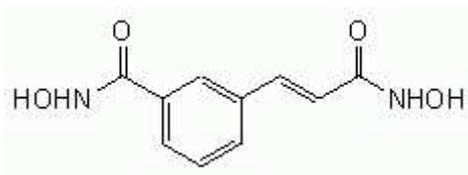


Abb. 1.14: Strukturformel von HDACi II ($C_{10}H_{10}N_2O_4$)⁽⁸⁵⁾

Der Histondeacetylaseinhibitor HDACi II (m-Carboxy-zimtsäure-bis-Hydroxamid, CBHA) ist ein zellpermeabler polarer Hybrid aus dem bis-Säurechlorid der m-Carboxy-zimtsäure und Hydroxylamin.

Die HDAC-Inhibition soll aus der Bindung des Hydroxamrestes an das Zinkatom des aktiven Zentrums der HDAC resultieren.

HDACi II inhibiert die Isoenzyme HDAC 1 und HDAC 3.⁽¹⁰⁶⁾

Neben dem Wachstumsstillstand und der Differenzierung transformierter Zellen bewirkt der HDACi II beispielsweise die Apoptose und Expression von CD95 in Neuroblastomzellen. ^(85, 105, 19)

1.8.3 Valproinsäure / Natriumvalproat

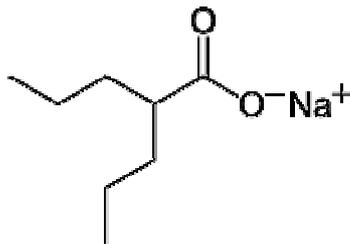


Abb. 1.15: Strukturformel von Natriumvalproat ⁽¹³⁶⁾

Die erstmals 1882 synthetisierte und seit mehr als 30 Jahren als Antiepileptikum zugelassene Valproinsäure (bzw. deren Salz Natriumvalproat) hat sich über dieses offizielle Indikationsgebiet hinaus als wirksam gegen bipolare Störungen und Migräne bzw. Cluster-Kopfschmerz gezeigt. Als diesbezügliche Wirkmechanismen werden die Blockade von neuronalen membranständigen Ionenkanälen bzw. ein präsynaptischer GABAerger Effekt angenommen.

Die mittlere Tagesdosis bei einer Langzeitbehandlung beträgt bei Erwachsenen, nach einschleichender Dosierung, um 20 mg Valproinsäure pro Kilogramm Körpergewicht. ⁽³⁰⁾

Darüber hinaus besitzt Valproinsäure die Eigenschaft eines Histondeacetylaseinhibitors - sie hemmt spezifisch das Isoenzym HDAC 2.

Sowohl bei soliden Malignomen als auch bei Leukämiezellen (einschließlich der AML) konnte eine Caspase-abhängige wie auch Caspase-unabhängige antiproliferative Aktivität der Valproinsäure nachgewiesen werden, welche zumindest teilweise der Histondeacetylasehemmung zugeschrieben wird. ^(68, 65, 58)

Diese Tatsachen macht sie, wie auch die übrigen Histondeacetylaseinhibitoren, zum interessanten Gegenstand der Krebsforschung.

Es gibt allerdings auch Hinweise, dass eine (antiepileptische) Therapie mit Valproat selbst zu Leukämien (AML und ALL) führen könnte.⁽²²⁾

Von den weiteren unerwünschten Wirkungen von Valproat sind vor allem das Auftreten einer passageren Thrombozyto- bzw. Leukopenie, eine zumeist reversible Enzephalopathie, Alopezie und dosisunabhängige, teils schwere Leberfunktionsstörungen sowie Teratogenität zu nennen.

1.9 Weitere antiproliferative Substanzen

1.9.1 Daunorubicin

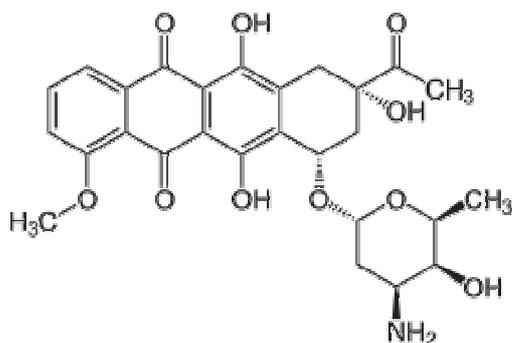


Abb. 1.16: Strukturformel von Daunorubicin⁽¹³⁴⁾

Das Anthrazyklin Daunorubicin ist ein von den Aktinobakterien *Streptomyces peuceticus* und *Streptomyces coeruleorubidus* produziertes Glykosid-Antibiotikum mit antineoplastischen Eigenschaften, welches in der Leukämie-therapie (AML und ALL) als Zytostatikum verwendet wird.

Neben einer DNA-Interkalation beruht der Wirkmechanismus auf Inhibition der Topoisomerase II und der Bildung freier Radikale.

Die intravenöse Einzeldosis in der AML-Therapie beträgt zwischen 0,5 mg und 3 mg pro Kilogramm Körpergewicht (entsprechend ca. 20 mg/m² bis 120 mg/m² Körperoberfläche), wodurch Plasmaspiegel bis 1 µM erreicht werden.

Unerwünschte Wirkungen sind unter anderem gastrointestinale Beschwerden, Alopezie, Myelosuppression und Kardiotoxizität.^(29, 113)

1.9.2 Tunicamycin

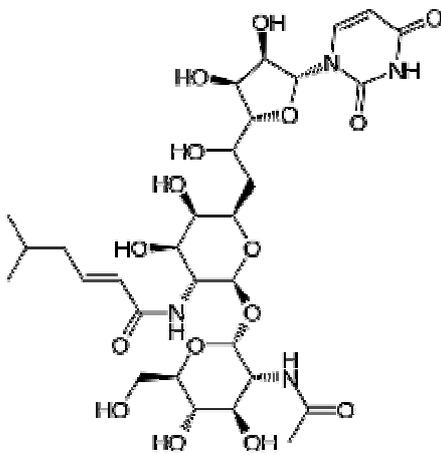


Abb. 1.17: Strukturformel von Tunicamycin ⁽¹³⁵⁾

Das seit langem experimentell genutzte Nucleosidantibiotikum Tunicamycin wird unter anderem von dem Bakterium *Streptomyces lysosuperficus* produziert und hemmt den ersten Schritt des Dolichol-Zyklus der N-Glykoproteinbiosynthese durch Inhibition bakterieller und eukaryotischer N-Acetylglucosamintransferasen.

Hierdurch wird eine N-glykosidische Proteinmodifikation verhindert und durch eine konsekutive Proteinefehlfaltung ER-Stress ausgelöst.

Des Weiteren bewirkt Tunicamycin den Zellzyklusarrest in der G1-Phase. ^(72, 125)

1.10 Zielsetzung dieser Dissertation

Die aufgezeigte Relevanz des Proteasoms bei Entstehung und Verlauf unter anderem onkologischer Erkrankungen legt dessen therapeutische Einbeziehung nahe. Die Hemmung des Ubiquitin-Proteasom-Systems hat insbesondere einen Effekt auf maligne, transformierte und proliferierende Zellen - in Dosen, die von nicht-malignen Zellen in vivo gut toleriert werden. ^(104, 26)

Jedoch ist die klinische Wirksamkeit der Bortezomib-Monotherapie bei Indikationen außerhalb von Myelom und Mantelzelllymphom unbefriedigend.

Es sollten daher neue molekular-basierte Kombinationstherapien auf der Basis einer Proteasominhibition in vitro entwickelt werden. Die AML sollte dazu als biologisch geeignete und klinisch relevante Modellerkrankung dienen. Diese Kombinationstherapien sollten dabei möglichst schon als zugelassene Medikamente zur Verfügung stehen (auch für andere Indikationen), um eine baldige Überprüfung des Konzeptes in einer akademischen klinischen Studie (*Investigator Initiated Clinical Trial*) zu ermöglichen.

Gegenstand dieser Dissertation ist daher, synergistische zytotoxische Effekte von Protease- und Proteasominhibitoren mit anderen Substanzgruppen und insbesondere mit bereits als Medikament verfügbaren Substanzen am Modell einer AML-Zelllinie sowie bei primären AML-Blasten zu identifizieren und zu charakterisieren.

Mit dem hier verwendeten innovativen *Active Site Label* DansylAhx₃L₃VS (DALVS) sollte dabei erstmals die Aktivität der einzelnen Proteasomuntereinheiten in intakten AML-Zellen dargestellt und untersucht werden. Dieses stellt ein zusätzliches Ziel meiner Dissertation dar.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zellen

THP-1 AML-Zellen aus dem peripheren Blut eines einjährigen männlichen Patienten mit rezidivierter Akuter Monozytenleukämie (1978), Lysozym produzierend, phagozytierend, Antigen-Expression: HLA A2, A9, B5, DRw1, DRw2; trägt t(9;11)(p21;q23), zum Fusionsgen MLL-AF9 führend; durchschn. Verdopplungszeit 35 bis 50 Stunden; ATCC Nummer: TIB-202 ⁽¹²⁶⁾

EL-4 Zelllinie, murine T-Zell-Lymphomzellen ^(60, 66)

primäre AML-Blasten Die Zellen wurden nach Genehmigung durch die zuständige Ethikkommission sowie Einholen eines schriftlichen Einverständnisses der Patienten (*informed consent*) aus peripherem Blut mittels Ficoll-Dichtezentrifugation gewonnen und zu einer Reinheit von > 90% angereichert;
Medizinische Klinik II, Eberhard Karls Universität Tübingen

2.1.2 Zellkulturmedium

RPMI 1640 Gibco[®], Firma Invitrogen (Karlsruhe), enthält 2 mmol/l L-Glutamin, 25 nM HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N-2-Ethan-Sulfonsäure), Phenolrot

FCS fetales Kälberserum, 10%, Gibco[®], Firma Invitrogen (Karlsruhe), 30 Minuten hitzeinaktiviert bei 56 °C

Penicillin 1.000 IU/ml Medium

Streptomycin 0,1 mg / ml Medium

2.1.3 Einfriermedium

RPMI 1640	70%, s.o.
FCS	fetales Kälberserum, 20% (hitzeinaktiviert)
DMSO	Dimethylsulfoxid, 10%

2.1.4 Puffer, Lösungen, Chemikalien

Ficoll[®]	Polysaccharid (Saccharose und Epichlorhydrin) zur Dichtegradientenzentrifugation, Firma Amersham / GE Healthcare (München)
---------------------------	--

2-fach-Lysepuffer (pH 7,4)

Tris-HCl	10 mM
EDTA	10 mM
Triton X-100	2 %, Firma AppliChem (Darmstadt)

Labelpuffer	wie Lysepuffer (s.o.) aber ohne Triton X-100
--------------------	--

Roti-Nanoquant-Arbeitslösung[®]	Firma Roth (Karlsruhe)
---	------------------------

BSA-Lösung	<i>bovine serum albumin</i> , Albumin Fraktion V [®] , Firma Roth (Karlsruhe)
-------------------	---

TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
-------------	------------------------------

2-fach-RSB (Probenpuffer, pH 6,8)

Tris	0,125 M
Glycerol	20%
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , 8%
Mercaptoethanol	40mM (280 µl ad 100 ml)
Bromphenolblau	
Milli-Q [®] - H ₂ O	

SDS-Laemmli-Puffer[®] (pH 8,3)

Tris Base	60,6 g
Glycin	283 g
SDS	20 g

4-fach Lower-Tris-Puffer (pH 8,8)

Tris-Base	1,5 M (= 181,71 g / l)
Tris-HCl	1,5 M (= 236,40 g / l)
SDS	0,4%

4-fach Upper-Tris-Puffer (pH 6,8)

Tris/HCl	0,5 M (78,8 g Tris HCl/l od. 60,57 g Tris Base/ l)
SDS	0,4%

Full Range Rainbow[®] - Marker GE Healthcare (München)

MultiMark[®] Firma Invitrogen (Karlsruhe)

Transferpuffer (pH 8,3)

Tris	12,5 mM (3,04 g/l)
Glycin	192 mM (14,28 g/l)
Methanol	20% (200 ml/l)
SDS	0,01%

PBS „10-fach“ *phosphate buffered saline;*

KCl	4 g
KH ₂ PO ₄	4 g
NaCl	160 g
Na ₂ HPO ₄	23 g

PBS „einfach“ 200 ml 10-fach PBS auf 2l mit Milli-Q

PBST	<i>phosphate buffered saline Tween</i>
PBS	„1-fach“
Tween [®] 20	Polysorbat-20, 0,1%
Roti-Block[®]	proteinfreie Blockierungslösung, Firma Roth (Karlsruhe)
Farbstofflösung	
Ponceau S	0,2 %
Essigsäure	5 %
Vectastain[®] Elite	<i>HRP (horse raddish peroxydase, Meerrettich- Peroxidase) und Streptavidin,</i> Firma Vector Labs (Burlingame, USA)
ECL-Lösung[®]	<i>„enhanced chemiluminescence“,</i> Amersham Biosci. / GEHealthcare (München)
- Lösung I	50 %
Luminol	2,5 mM
p-Coumarsäure	0,4 mM
Tris-HCl	100 mM , pH 8,5
- Lösung II	50 %
Tris-HCl	100 mM , pH 8,5
CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	
	Firma Promega (Mannheim)
MTS	3-(4,5-Dimethylthiozol-2-yl)-5-(3-carboxymeth- oxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazoliumsalsz
PES	Phenazin-Ethosulfat

2.1.5 Inhibitoren (siehe auch Einleitung, Kapitel 1.7 und 1.8)

Ritonavir

HIV-Proteaseinhibitor,
 Norvir[®], Abbott Lab. Ltd. (Chicago, USA);
 Thiazol-5-ylmethyl{(αS)-α[(1S,3S)-1-Hydroxy-3-
 ((2S)-2-{3-[(2-Isopropylthiazol-4-yl)Methyl]-3-
 Methylureido}-3-Methylbutyramido)-4-Phenyl-
 Butyl]phenethyl)-Carbamat;
 C₃₇H₄₈N₆O₅S₂; Molekulargew.(MG): 720,95 g/mol

Bortezomib

Proteasominhibitor, Velcade[®],
 Firma Janssen-Cilag (Neuss),
 N-[(1S)-1-Benzyl-2-[[[(1R)-1-(Dihydroxyboranyl)-
 3-Methylbutyl]amino}-2-Oxoethyl]pyrazin-
 Carboxamid; C₁₉H₂₅BN₄O₄; MG: 384,24 g/mol

AdaAhx₃L₃VS (ALVS)

Proteasominhibitor,
 Adamantan-Acetyl-1-Amino-6-Hexanoyl-
 Carboxy-Benzyl-Leucyl-Leucyl-Leucin-
 Vinylsulfon; C₅₀H₈₈N₆O₈S; MG: 932,6 g/mol
 Calbiochem[®], Firma Merck (Darmstadt)

AdaK(bio)Ahx₃L₃VS (BioALVS)

Proteasominhibitor, biotinyliertes AdaAhx₃L₃VS
 Calbiochem[®], Firma Merck (Darmstadt)

DansylAhx₃L₃VS (DALVS)

zellpermeabler Proteasominhibitor,
 AdaAhx₃L₃VS mit Dansylsulfonamidohexanoyl-
 Hapten, freundlicherweise zur Verf. gestellt von
 Labor M.Verdoes, H.Overkleef (Leiden,NL)⁽¹¹⁾

NLVS	<p>Proteasominhibitor, (NIP [4-Hydroxyl-5-Iodo-3-Nitr ophenylacetat] - Leucyl-Leucyl-Leucin-Vinylsulfon); $C_{28}H_{43}IN_4O_8S$; MG: 722,6 g/mol, Calbiochem[®], Firma Merck (Darmstadt)</p>
Natriumvalproat	<p>Histondeacetylaseinhibitor, Antikonvulsivum, Orfiril[®], Firma Desitin (Hamburg), 2-Propylpentansäure; $C_8H_{15}NaO_2$, MG: 166,2 g/mol</p>
HDACi I	<p>Histondeacetylaseinhibitor I, (MS-(27-)275, Entinostat, SNDX-275), N-(2-Aminophenyl)-4-[N-(Pyridin- 3-ylmethoxycarbonyl)aminomethyl]benzamide; $C_{21}H_{20}N_4O_3$, Calbiochem[®], Firma Merck (Darmstadt)</p>
HDACi II	<p>Histondeacetylaseinhibitor II, (CBHA), m-Carboxycinnamic Acid bis-Hydroxamide; $C_{10}H_{10}N_2O_4$, Calbiochem, Fa. Merck (Darmstadt)</p>
Daunorubicin	<p>Anthrazyklin-Zytostatikum, (1S,3S)-3-Acetyl-3,5,12-Trihydroxy- 10(Methyloxy)-6,11-Dioxo-1,2,3,4,6,11- Hexahydrotetracen-1-yl-3-Amino-2,3,6-Trideoxy- α-L-Lyxo-Hexopyranosid; $C_{27}H_{29}NO_{10}$; MG: 527,52 g/mol, Fa.Pfizer (Berlin)</p>

Tunicamycin Nukleosidantibiotikum, ER-Stress-Induktor,
 3-Acetamido-4,5-Dihydroxy-6-(Hydroxymethyl)-
 oxan-2-yl]oxy-6-[2-[(2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-
 Dioxopyrimidin-1-yl)-
 3,4-Dihydroxyoxolan-2-yl]-2-Hydroxyethyl]-4,5-
 Dihydroxyoxan-3-yl]-5-Methylhex-2-Enamid;
 $C_{39}H_{64}N_4O_{16}$; 840,0 g/mol,
 Firma biomol (Hamburg)

2.1.6 Antikörper

Anti-Dansyl Rabbit Dansyl-Sulfonamidohexanoyl-spezifischer
 polyklonaler Antikörper;
 Molecular Probes[®], Firma Invitrogen (Karlsruhe)

Anti-Rabbit-Biotin Meerrettichperoxidase-gekoppelter sekund. AK
 Fa. Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

Anti-CHOP (Gadd 153) Fa. Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

Anti-BiP (Grp78) Firma Becton Dickinson (Heidelberg)

Anti-PDI rabbit freundlicherweise zur Verfügung gestellt von
 H. Ploegh (MIT, Boston, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Patientenzellen

Mit Hilfe der Ficoll[®]-Hypaque-Dichtezentrifugation wurden AML-Blasten aus dem peripheren Vollblut von Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie isoliert. Das Lymphozytenseparationsmedium Ficoll[®] hat die gleiche Dichte wie menschliche Lympho- und Monozyten ($\rho = 1,077$), wodurch sich diese bei der Zentrifugation in Form eines weißen Ringes (*buffy coat*) anreichern. Oberhalb dieser Interphase befinden sich Plasma und Thrombozyten, unterhalb Granulozyten und schließlich Erythrozyten. Zur Separation der Blasten wurde eine ca. 50 ml umfassende Blutprobe auf zwei 50 ml-Falcons[®] verteilt und mit sterilem PBS (Raumtemperatur) auf 50 ml aufgefüllt. Pro Falcon[®] mit jeweils 20 ml Ficoll[®] (insgesamt vier Stück) wurden langsam 25 ml der verdünnten Blutprobe überschichtet. Das Ganze wurde nun für 20 Minuten bei 2.000 rpm ungebremst zentrifugiert. Die Interphase mit den Blasten wurde abgenommen und auf vier neue Falcons[®] verteilt wurde. Anschließend folgten mindestens zwei Waschgänge mit 50 ml bzw. 10 ml kaltem PBS und Zentrifugation (gebremst) bei 1.200 rpm über sechs Minuten.

Im Falle der gleichzeitigen Bearbeitung von Blutproben verschiedener Patienten wurden diese nie gemischt und separate serologische Pipetten verwendet.

Die nun isolierten AML-Blasten konnten in Kultur genommen oder eingefroren werden (siehe unten).

2.2.2 Zellkulturen

2.2.2.1 Kultivierung der Zellen

Sowohl die Patientenzellen also auch die THP-1- und EL-4-Zellen wurden in durch fetales Kälberserum und Penicillin-Streptomycin ergänztem RPMI 1640[®] als Suspension kultiviert. Die Lagerung erfolgte bei 37 °C in Kulturflaschen mit einer Bodenfläche von 75 bis 175 cm² in einem mit 95% Luft und 5% CO₂ begasten Brutschrank. Eine Zelldichte von mehr als 10⁶ Zellen/ml wurde nicht überschritten. Bei Bedarf wurden die Zellen bei 800 rpm für 8 Minuten

zentrifugiert und pelletiert, woraufhin sie resuspendiert auf neue Kulturflaschen verteilt oder zum Zweck der Kryokonservierung weiterbehandelt wurden.

2.2.2.2 Kryokonservierung der Zellen

Überschüssige Zellen wurden für die Gefrierkonservierung in Aliquots zu ca. 10^7 Zellen/ml für 5 Minuten bei 800 rpm und 4°C pelletiert, dann mit jeweils 0,5 ml eisgekühltem Einfriermedium in Kryoröhrchen resuspendiert und zunächst über 48h in einem -70°C kaltem Isopropanolbad gelagert. Danach wurden die Röhrchen in Flüssigstickstoff bei -196 °C tiefgefroren.

Das in dem Einfriermedium enthaltene DMSO ist ein wasserfreies Lösungsmittel und verhindert die Kristallisation der Zelllösung. Aufgrund seiner Zellmembran schädigenden Wirkung erfolgte die Vorbereitung auf die Kryokonservierung unter permanenter Kühlung.

Zur Rekultivierung kryokonservierter Zellen wurden diese noch in den Kryoröhrchen in einem 37°C warmen Wasserbad angetaut, bis die Pellets in 5 ml ebenfalls 37°C messendes Medium RPMI 1640[®] gegeben werden konnten. Nach einer achtminütigen Zentrifugation bei 800 rpm wurde der resultierende Überstand abgesaugt, die Zellen mit wenig Medium resuspendiert und in kleine oder mittlere mit Medium gefüllte Kulturflaschen (25 bzw. 75 cm² Bodenfläche) überführt. Zunächst sollten die Zellen relativ dicht wachsen, bis sie unter den oben beschriebenen Bedingungen weiterkultiviert wurden.

2.2.2.3 Tiefkühlung der Zellen

Zur Konservierung der Zellen für spätere Zelllysate wurden die entsprechenden Pellets nach der unter Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Zentrifugation mit PBS in 50-ml-Falcons[®] gewaschen, mit 1 ml PBS resuspendiert und in einer Kühlzentrifuge (5°C) bei 2.000 rpm für drei Minuten pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellpellets in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -20°C tiefgefroren. Der Auftauvorgang war der gleiche wie oben beschrieben.

2.2.2.4 Wachstumskontrolle und Zellzahlbestimmung

Die Vitalität der Zellen wurde unter dem Mikroskop (gegebenenfalls nach Anfärbung mit Trypanblau im Volumenverhältnis 1:1 mit der Zellsuspension) anhand der runden Form, einer nur geringfügigen Granulation und einem hellen Randsaum beurteilt.

Neben der durch Phenolrot bedingten gelblichen Färbung des Mediums bei Abnahme des pH-Wertes war die Dichte des Zellwachstums ausschlaggebend für die Erneuerung des Nährmediums.

Die Zellzahl wurde anhand von 10 µl der mit Trypanblau gefärbten Suspension in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Das Doppelte der mittleren Zellzahl innerhalb eines Großquadrates mit 10^4 multipliziert entspricht dabei der Anzahl der Zellen pro Milliliter Zellsuspension. Die maximale Dichte sollte 1×10^6 Zellen/ml nicht überschreiten.

2.2.3 Proliferationstest und dessen Auswertung

Um die Auswirkung der zu testenden Stoffe auf das Wachstumsverhalten der THP-1- bzw. Patientenzellen zu beobachten, wurden diese zusammen mit den entsprechenden Konzentrationen verschiedener Inhibitoren (siehe Kapitel 3, „Ergebnisse“) kultiviert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde die jeweilige Zellproliferation mithilfe des *CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assays* (Firma Promega) gemessen.

Als Kontrolle dienten das Medium RPMI 1640[®], die Zelllösungen mit DMSO sowie die reinen Zellsuspensionen.

Bei dem genannten Assay handelt es sich um ein kolorimetrisches Verfahren, welches als Reagenz eine Lösung aus MTS und PES (s.o.) verwendet. Wird das MTS chemisch reduziert, entsteht das farbige Formazan, dessen Menge, indirekt gemessen anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm, direkt proportional zu der Menge der lebenden Zellen in der getesteten Probe ist. Das in der Reagenzlösung enthaltene PES dient als stabilisierender Elektronenfänger. Es wird angenommen, dass für die MTS-Reduktion die von den metabolisch aktiven Zellen gebildeten Reduktionsäquivalente NADPH oder

NADH verantwortlich sind. Bei stärkerem Zellwachstum sind somit höhere Absorptionswerte zu beobachten.

Die Proben befanden sich in transparenten 96-Well-Mikrotiterplatten, deren Näpfe jeweils in dreifacher Ausführung die zu testenden Inhibitoren mit jeweils 5.000 Zellen (Patientenzellen: 50.000) bzw. die Kontrollen enthielten. Die Testlösungen hatten je ein Volumen von 100 μ l.

Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit in einem Brutschrank (37 °C, 95% Luft, 5% CO₂) wurde jedem Well 20 μ l der MTS-/PES-Lösung zugegeben, eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert und die Absorption des entstandenen Formazans bei 492 nm in einem Tecan Spectrafluor[®] Photospektrometer gemessen. ^(95, 54)

Die statistische Beurteilung ausgewählter Kombinationsversuche hinsichtlich des antiproliferativen Effektes zweier gleichzeitig verabreichter Inhibitoren unterschiedlicher Dosierungen erfolgte mithilfe normalisierter Isobogramme nach Chou.⁽¹⁸⁾ Anhand des hierbei ermittelten und grafisch dargestellten *combination index* (CI) kann eine Aussage über eine synergistische (CI < 1), eine additive (CI = 1, Isobole als punktierte Linie dargestellt) bzw. eine antagonistische Wirkung (CI > 1) der jeweiligen Inhibitor-Kombination getroffen werden.

2.2.4 Erstellen einer BSA-Eichgerade

Für die unten beschriebene Bestimmung des Proteingehaltes eines Zelllysates ist zunächst die Erstellung einer Eichgerade notwendig. Hierfür wurden pro Mikrotiterplatten-Napf 200 μ l Roti-Nanoquant Arbeitslösung[®] sowie in aufsteigendem Volumen (0, 1, 3, 5, 7 und 10 μ l) eine BSA-Lösung (*bovine serum albumin*) mit bekannter Proteinkonzentration pipettiert. Diese Lösung wurde mit deionisiertem Wasser (Milli-Q[®]) auf 250 μ l aufgefüllt, woraufhin aus den bei 590 und 450 nm gemessenen Absorptionswerten die Eichgerade ermittelt werden konnte.

2.2.5 Lysierung der Zellen und Proteinbestimmung (modifiziert nach Bradford)

Um den Proteingehalt der Zellen messen und die weiter unten beschriebenen Tests mit ihnen durchführen zu können, wurde ein Teil Zellsuspension (10 ml) als mehrfache Proben über fünf Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in PBS resuspendiert. Die neu entstandene Suspension wurde daraufhin für drei Minuten bei 2.000 rpm in einer Kühlzentrifuge (5 °C) pelletiert, und der Überstand wiederum abgenommen. Das Pellet (bestehend aus den Zellmembranen und -trümmern) wurde nun mit 2-fach-Lysepuffer etwa gleichen Volumens suspendiert. Das enthaltene EDTA hemmt die Serin-Proteasen, während Triton X-100 als Detergenz die eigentliche Lyse der Zellen bewirkt. Das Ganze wurde nach dreißigminütiger Kühlung auf Eis für zehn Minuten bei 13.000 Umdrehungen zentrifugiert (5 °C). 1 µl des Überstandes (somit des Zelllysates) wurden daraufhin zu 200 µl Roti-Nanoquant Arbeitslösung[®] in eine transparente Mikrotiterplatte gegeben. Dazu kamen 49 µl deionisiertes Wasser. Um den Proteingehalt der Suspension zu bestimmen, wurde kolorimetrisch die Absorption bei Wellenlängen von 590 nm und 450 nm gemessen. Der Mittelwert bei 590 nm (x) dividiert durch jenen bei 450 nm (y) ergibt den Quotienten z, welcher gemäß der mit den Zellen erstellten Eichkurve der zu ermittelnden Menge Protein in Mikrogramm pro Mikroliter (µg/µl) Zellsuspension entspricht. Bei Bedarf kann das so gewonnene Gesamtzelllysate nach vorherigem Schockgefrieren mit Flüssigstickstoff bei -20 °C eingefroren werden.

2.2.6 Aktivitätsmarkierung der Proteasomuntereinheiten (Active Site Label) / SDS-Gelelektrophorese

2.2.6.1 Active Site Label intakter Zellen mittels DALVS

Um das Proteasom in den lebenden Zellen zu inhibieren wurden jeweils ca. 5×10^6 Zellen in 1 ml Medium suspendiert und Proben ohne Inhibitor (nur mit 0,8 μ l DMSO), mit subeffektiver, grenzwertig niedriger und starker Inhibitor-Konzentration hergestellt. Die Kontrollprobe ohne Wirkstoff wurde ca. 20 Minuten lang gekocht (95 °C); die anderen Proben für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert, in Eppendorfgefäße überführt und für vier Minuten bei 2.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 100 μ l Medium aufgenommen, zu denen 1 μ l einer 100 μ M DansylAhx₃L₃VS-Lösung (DALVS) pipettiert wurden, sodass eine Zellsuspension mit 1 μ M DALVS entstand. Diese wurde eine Stunde lang im Brutschrank inkubiert und dann bei 2.000 rpm über 4 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun schockgefroren und bei -20 °C gelagert oder, wie oben beschrieben, gleich lysiert. Darauf folgte eine SDS-PAGE sowie ein Western Blot (s.u.).

2.2.6.2 Active Site Label lysierter Zellen mittels BioALVS

Eppendorfgefäße wurden zunächst mit Labelpuffer befüllt. Hinzu kam das jeweilige Gesamtzelllysat mit der höchsten verwendeten Proteinkonzentration (90 μ g Protein) ohne Inhibitor, als Kontrolle lediglich mit 0,8 μ l DMSO, welches auch Bestandteil der Inhibitor-Verdünnungslösungen ist. Die entstandene Suspension wurde daraufhin 15 Minuten lang abgekocht und anschließend für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Eine Zellprobe mit 50 μ M NLVS diente als Positivkontrolle.

Für die wirkstoffhaltigen Proben wurden 30 μ l Labelpuffer in Eppendorfgefäße vorgelegt und dann Gesamtzelllysat mit dem gewünschten Proteingehalt sowie die zu untersuchenden Inhibitorkonzentrationen (niedrige, grenzwertig wirksame und hohe Konzentration) hinzupipettiert.

Hinzu kamen jeweils 0,8 µl einer 100 µM-Lösung von AdaK(bio)Ahx₃L₃VS (BioALVS), dessen Biotin-Bestandteil das aktive Zentrum der Proteasom-untereinheiten bindet. Diese Suspension wurde nun für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Dann kamen je Eppendorfgefäß 18 µl 6-fach RSB (= Probenpuffer) hinzu, das die Proteine löst, während SDS als Detergenz wirkt, indem es mit seinem Fettsäureanteil an die hydrophoben Bezirke der Proteine bindet, welche sich folglich entfalten, wodurch keine Wechselwirkungen zwischen diesen und anderen Proteinen bzw. Lipiden mehr entstehen können.

Zur Denaturierung wurde die Lösung nun für acht bis zehn Minuten bei 95 °C abgekocht. Schließlich fand eine Zentrifugation für eine Minute bei 13.000 rpm (ungekühlt) statt. Nun können die Proben wie unten beschrieben auf das Elektrophorese-Gel gegeben oder alternativ bei -20 °C gelagert werden.

2.2.6.3 SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese), modif. n. Laemmli

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde nach der jeweiligen Aktivitätsmarkierung (DALVS oder BioALVS) eine Gelelektrophorese unter Verwendung von Fertig-Gelen (Firma Serva, Heidelberg) durchgeführt.

Neben dem Molekulargewichtsmarker (MultiMark[®]) wurden die Proben bzw. Kontrollen in die Gel-Bahnen pipettiert. Als Pufferlösung wurde 1-fach-SDS-Laemmli-Puffer verwendet. Die Apparatur lief daraufhin über Nacht bei einer konstanten Stromspannung von 60 V.

2.2.6.4 Transfer und Blotting

Nach Abnahme des Gels wurde dieses für ca. 30 Minuten in Transferpuffer schwenkend äquilibriert. Währenddessen wurde eine größenangepasste PVDF-Blot-Membran für drei Minuten in Methanol aktiviert, fünf Minuten lang in deionisiertes Wasser gelegt und anschließend ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde das Gel zusammen mit der Membran zwischen zwei zuvor in Transferpuffer eingeweichten Whatman-Papieren und Schwämmen in einen Blot-Rahmen gespannt. Der Proteintransfer fand über 150 Minuten in einem Kühlraum (4 °C) bei einer konstanten Stromstärke von

450 mA statt. Nach einem kurzen Abspülen mit deionisiertem Wasser wurde die trockene Membran bei Bedarf kühl (4 °C) gelagert oder weiter für die Chemilumineszenz vorbereitet. Zur Darstellung der transferierten Proteine kann sie mit einer Ponceau-S-Färbelösung für ca. fünf Minuten gefärbt werden. Der Farbstoff muss anschließend für ca. eine halbe Stunde in einem Bad mit 50 mM Tris und 150 mM NaCl (pH 8,0) entfernt werden. Zu diesem Zweck wurde die Membran nach einer gründlichen Spülung und zweimaligem fünfminütigem Schwenken mit PBST in ein Roti-Block[®] - Bad (10% Roti-Block[®] in PBST) gelegt und im Kühlraum bei 4 °C über Nacht schwenkend geblockt. Dies ist notwendig, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern.

Mithilfe eines Dansyl-Sulfonamidohexanoyl-spezifischen polyklonalen Antikörpers (Anti-Dansyl (Rabbit) 1:2.000, eine Stunde in Roti-Block[®] bei Raumtemperatur inkubiert), einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (Anti-Rabbit-Biotin 1:5.000, 45 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur) sowie einem nachgeschalteten Verstärkersystem (Streptavidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase, Vectastain[®], eine Stunde bei Raumtemperatur) wurde ein Western Blot angefertigt, welcher die katalytischen Proteasomuntereinheiten sichtbar machte.

Im Falle der Aktivitätsmarkierung mit BioALVS entfällt hingegen der erste Antikörper, da das Vectastain[®] direkt an dem Biotinrest bindet.

Es folgte die anschließende Darstellung der Proteine mittels Chemilumineszenz wie unten beschrieben.

2.2.6.5 Chemilumineszenz

Nachdem die Membran blockiert wurde, folgte ein sorgfältiges Spülen mit PBST (dreimaliges kurzes Abspülen, dreimal fünfminütiges Schwenken). Dann wurde die Membran in ein Vectastain[®]-Bad überführt und dort eine Stunde lang geschwenkt. Vectastain[®] beinhaltet neben Streptavidin eine Meerrettich-Peroxidase, die zusammen mit Avidin eine vernetzte dreidimensionale Struktur ausbildet, wodurch das Chemilumineszenz-Signal und damit die Protein-

Detektions-Sensitivität erhöht wird. Darauf folgte erneut ein mehrfaches Spülen und dreimal 15 Minuten Schwenken in PBST.

Die licht- und temperaturempfindliche ECL-Lösung wurde nun aus zwei Einzel-Lösungen des ECL Plus[®]-Kits hergestellt, die Membran für eine Minute in ihr gebadet und dann mit der Substratseite nach oben in eine Filmkassette mit ECL-sensitivem Film eingelegt. Die geblotteten Proteine wurden nun in einer Entwicklermaschine auf dem Film sichtbar gemacht.

Nach der Detektion der aktiven Proteasomuntereinheiten können noch weitere Proteine auf diesem oder auch einem neuen Blot dargestellt werden.

Mittels Antikörpern gegen die UPR-assoziierten Proteine CHOP (Gadd 153), BiP (Grp78) und PDI prüfte ich die Auswirkung der Inhibitoren Bortezomib und Ritonavir auf das Endoplasmatische Retikulum. Der Nachweis der genannten Proteine mittels Western Blot spiegelt ER-Stress wider. ^(11, 60)

3 ERGEBNISSE

Ziel der hier beschriebenen Versuche war, den Einfluss verschiedener Wirkstoffe auf die Proliferation der untersuchten Zellen (monozytäre THP-1- bzw. Patientenzellen, Kontrollzellen) zu erfassen, sowie anhand spezieller Methoden Aussagen über den jeweiligen Wirkmechanismus treffen zu können.

Die im Kapitel „Material und Methoden“ beschriebene CellTiter-Methode („CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“) erwies sich als zu diesem Zweck gut geeignet, was sich in der hierfür angefertigten Eichkurve (Abb. 3.1) widerspiegelt. Der Effekt unterschiedlicher Wirkstoffkonzentrationen wurde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten in Beziehung zur Kontrollprobe (THP-1- bzw. Patientenzellen in Medium mit DMSO ohne Zugabe eines Inhibitors) gesetzt. Jede Wirkstoffkonzentration bzw. Kontrolle wurde pro Versuch dreifach getestet, indem jeweils drei Wells der Mikrotiterplatten identisch bestückt wurden. Die Anzahl der darüber hinaus separat durchgeführten Versuche wird weiter unten als $n=x$ angegeben.

Eine vollständige Wirkung zeigte sich nach 48 Stunden Inkubationszeit, weshalb diese für die unten aufgeführten Kombinationsversuche gewählt wurde. Zudem empfiehlt auch das Protokoll des „CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assays“ Inkubationszeiten von 48 bis 72 Stunden.

Um auf der Proliferationshemmung aufbauend genauere Aussage über den Wirkmechanismus bzw. die Zielstrukturen der Substanzen treffen zu können, bedurfte es Methoden zur Abbildung der Effekte auf Proteinebene:

Dank des innovativen *Active Site Labelling* mittels Anti-DALVS Western Blots war es erstmals möglich, semiquantitativ die Aktivität der jeweiligen Proteasomuntereinheiten in lebenden Zellen darzustellen.

Die vergleichend hinzugezogenen Western Blots gegen nicht-zellpermeables biotinyliertes BioALVS stellen die Proteasomuntereinheiten in lysierten Zellen dar. Da sowohl der Substanz Ritonavir als auch Bortezomib eine Induktion von zur Apoptose führendem ER-Stress zugeschrieben worden war (siehe Kapitel „Einleitung“), griff ich zu dessen Darstellung auf Western Blots gegen die UPR-assoziierten Proteine BiP, CHOP und PDI zurück.

3.1 Eichkurve

Der Anteil metabolisch aktiver und damit vitaler Zellen in der Zellkultur wurde mittels MTS-Assay gemessen.

Zunächst wurde dazu eine Eichkurve erstellt, welche ein lineares Verhältnis zwischen Zellzahl pro *Well* und photometrisch gemessener Absorption zeigt.

In den weiter unten aufgeführten Versuchsreihen wurden pro *Well* 5.000 Zellen der AML-Zelllinie THP-1 verwendet, da hier ein optimales Wachstum zu beobachten war und diese Anzahl darüber hinaus dem Protokoll des verwendeten „CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assays“ entspricht.

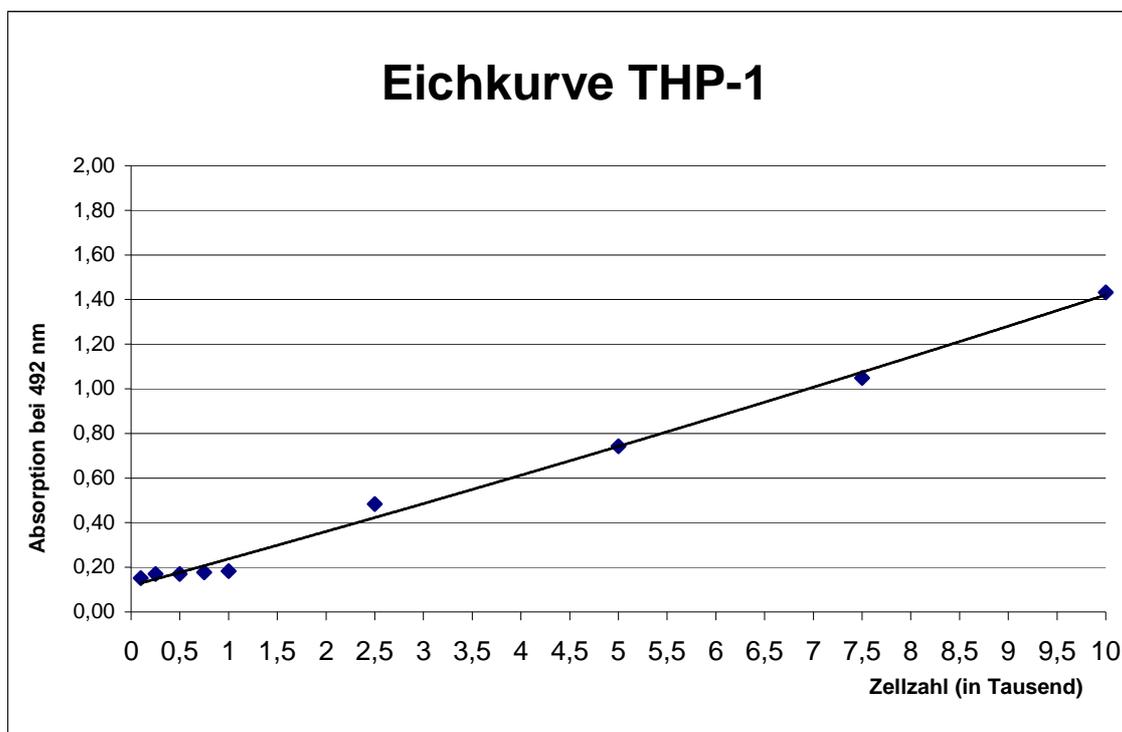


Abb. 3.1: Eichkurve zur Darstellung des Verhältnisses Absorptionsrate zu Zellzahl/ μ l.

Die jeweilig angegebene Anzahl von THP-1-Zellen wurde gemäß den Herstellerangaben im „CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ eingesetzt und die Absorption des entstehenden Farbstoffes Formazan bei 492 nm photometrisch bestimmt.

3.2 Einzelversuche zur Zellproliferation unter Bortezomib bzw. Ritonavir

3.2.1 Bortezomib

3.2.1.1 CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay zur Darstellung der antiproliferativen Wirkung von Bortezomib auf THP-1-Zellen

Der Proteasominhibitor Bortezomib wurde in Konzentrationen zwischen 5 nM und 50 nM getestet. In der klinischen Anwendung werden Plasmaspiegel von 10 nM bis 20 nM erreicht.

Bortezomib reduzierte die Proliferation nach 12 Stunden Inkubationszeit in einer Konzentration von 5 nM auf 93,84 % und in einer Konzentration von 50 nM auf 70,75 %.

Während sich unter 5 nM Bortezomib die Proliferationsrate nach 24 Stunden bei diesem Versuch noch auf 95,01 % belief, fiel diese bei 50 nM auf 43,35 % ab. Nach 48 Stunden zeigten sich Proliferationswerte von 88,53 % (5 nM) bis 32,47 % (50 nM Bortezomib).

Die 72-stündige Inkubation mit Bortezomib führte zu einer Proliferationsminderung auf 49,07 % in der 5 nM Lösung bzw. auf 24,84 % in einer 50 nM Lösung dieses Inhibitors.

Tabelle 3.1: Einfluss von Bortezomib auf die Proliferation der THP-1-Zellen

(Mittelwerte; 24 und 48 h Inkubation: n = 4, 12 und 72 Stunden: n = 1):

Bortezomib	0 nM	5 nM	10 nM	20 nM	30 nM	50 nM
12h Inkubation	100%	93,84%	83,07%	83,34%	79,78%	70,75%
24h Inkubation	100%	95,01%	78,80%	66,31%	61,41%	43,35%
48 h Inkubation	100%	88,53%	73,16%	66,90%	53,04%	32,47%
72 h Inkubation	100%	49,07%	45,72%	38,81%	37,09%	24,84%

Tabelle 3.2: Standardabweichungen der gleichen Versuchsreihe (n = 4)

Bortezomib	5 nM	10 nM	20 nM	30 nM	50 nM
24h Inkubation	16,61%	7,83%	6,86%	10,21%	10,62%
48 h Inkubation	24,37%	17,93%	14,03%	2,10%	8,65%

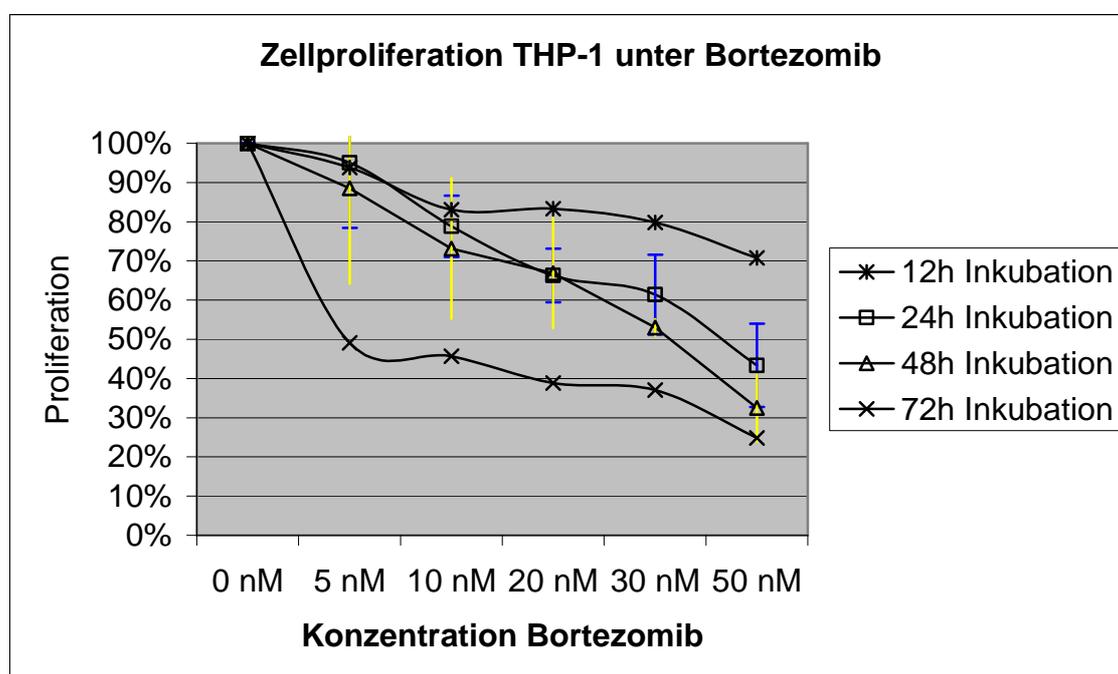


Abb. 3.2: Einfluss von Bortezomib auf die Proliferation der THP-1-Zellen.

THP-1-Zellen wurden über unterschiedlich lange Inkubationszeiten ansteigenden Konzentrationen von Bortezomib ausgesetzt (siehe Legende). Wie im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben, wurde anhand der photometrisch gemessenen Absorptionswerte mithilfe des MTS-Assays „CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ die Proliferation im Verhältnis zur Kontrolle ohne Inhibitor bestimmt.

Bortezomib hemmte in steigender Konzentration zunehmend die Proliferation der THP-1-Zellen.

3.2.1.2 Darstellung der aktiven Proteasomuntereinheiten in lebenden THP-1-Zellen mittels DALVS

Das *Active Site Labelling* mittels Western Blot gegen DALVS (DansylAhx₃L₃VS) diene hier zur Darstellung der Aktivität der katalytischen β -Untereinheiten des Proteasoms der THP-1-Zellen unter 48-stündiger Bortezomib-Einwirkung in steigenden Konzentrationen. Ab einer Bortezomib-Konzentration von 20 nM fällt eine verminderte Aktivität der $\beta 1(i)$ - / $\beta 5(i)$ -Untereinheiten mit einem Molekulargewicht um 20 kDa auf. Unter Einwirkung von 50 nM Bortezomib waren diese Untereinheiten vollständig gehemmt. Die $\beta 2$ -Untereinheiten wurden durch Bortezomib nicht inhibiert.

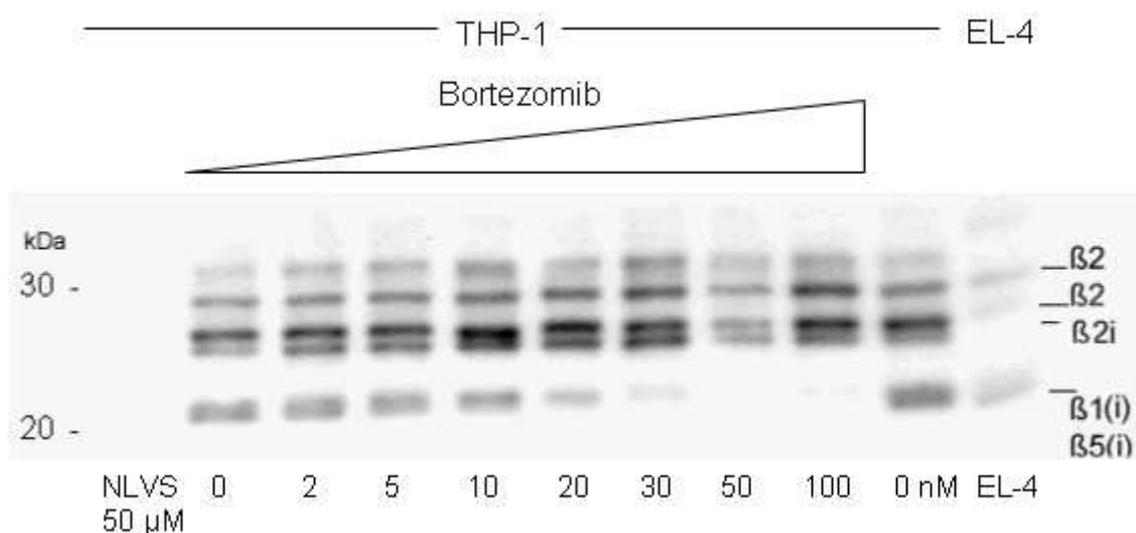


Abb. 3.3: Anti-DALVS Western Blot mit Bortezomib [nM].

Zellen: THP-1, Kontrollzellen: EL-4, Kontrollinhibitor: NLVS, 48 Stunden Inkubation

THP-1-Zellen wurden für 48 Stunden den genannten Konzentrationen von Bortezomib ausgesetzt. Wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, wurden daraufhin die katalytischen Untereinheiten der intakten Zellen mittels DALVS markiert (*Active Site Label*) und ein Western Blot gegen Anti-DALVS angefertigt.

Wie in den Western Blots mit Ritonavir wurden EL-4-Zellen als Kontrollzellen zur Proteasomdarstellung verwendet.

Als Kontrollprobe diente erneut der Proteasominhibitor NLVS (50 μ M) - eine vollständige Hemmung aller β -Untereinheiten ist sichtbar.

Es imponiert eine verminderte Aktivität der $\beta 1(i)$ -/ $\beta 5(i)$ -Untereinheiten mit einem Molekulargewicht um 20 kDa ab einer Bortezomib-Konzentration von 20 nM. 50 nM Bortezomib hemmten diese Untereinheiten vollständig. Die $\beta 2$ -Untereinheiten wurden durch Bortezomib nicht inhibiert.

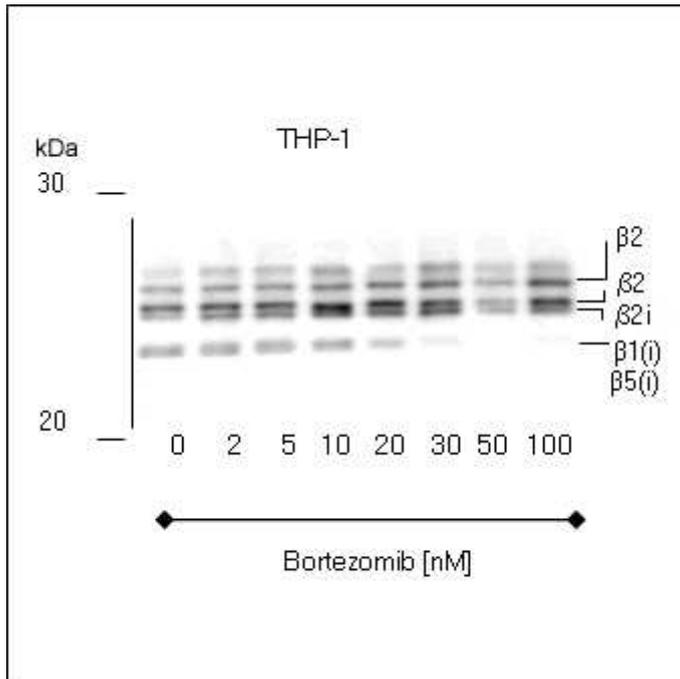


Abb. 3.4: Weiterer Anti-DALVS Western Blot mit Bortezomib [nM].

Zellen: THP-1, Kontrollzellen: EL-4, 48 Stunden Inkubation

In diesem DALVS-Western Blot zeigt sich erneut, dass Bortezomib selektiv die $\beta 1(i)$ - und $\beta 5(i)$ -Untereinheiten inhibierte. Besonders deutlich wird dies ab einer Konzentration von 20 nM.

3.2.1.3 Darstellung der aktiven Proteasomuntereinheiten in lysierten THP-1-Zellen mittels BioALVS

Mithilfe eines Western Blots gegen biotinyliertes AdaAhx₃L₃VS (AdaK(bio)Ahx₃L₃VS) konnte die Wirkung von Bortezomib auf die katalytischen β -Untereinheiten des Proteasoms lysierter THP-1-Zellen dargestellt werden. Bortezomib hemmte selektiv die $\beta 1(i)$ - und $\beta 5(i)$ -Untereinheiten ab 10 nM. Unter Einwirkung von 50 μ M NLVS als Kontrolle waren diese Untereinheiten ebenfalls inhibiert.

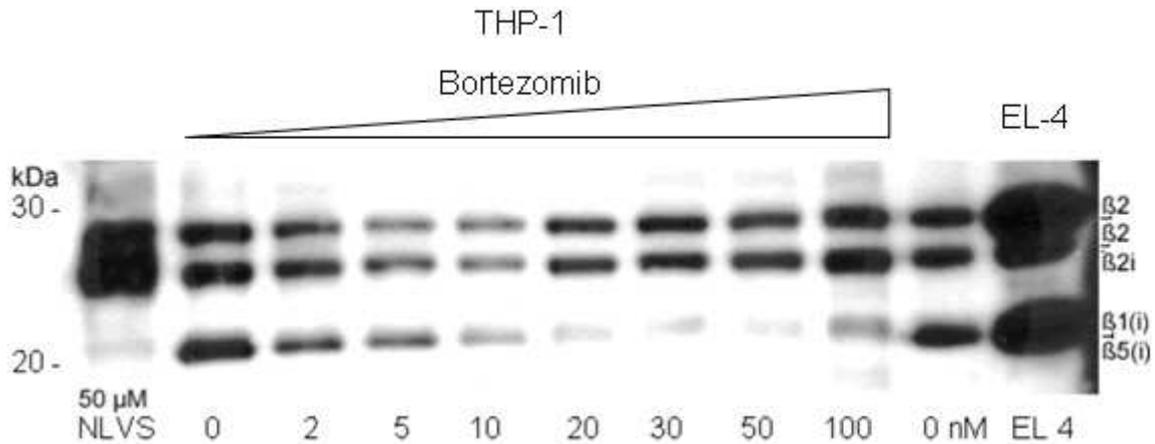


Abb. 3.5: Anti-AdaK(bio)Ahx₃L₃VS (BioALVS) Western Blot mit Bortezomib [nM].

Zellen: THP-1, Kontrollzellen: EL-4, Kontrollinhibitor: NLVS, 48 Stunden Inkubation

Dieser Western Blot gegen biotinyliertes AdaAhx₃L₃VS (AdaK(bio)Ahx₃L₃VS, siehe Kapitel „Material und Methoden“) stellt die Wirkung von Bortezomib auf die katalytischen β -Untereinheiten des Proteasoms lysierter THP-1-Zellen dar. Hier wird eine selektive Hemmung der β 1(i)- und β 5(i)-Untereinheiten ab 10 nM deutlich. Die β 2-Untereinheiten wurden durch Bortezomib auch hier nicht inhibiert.

50 μ M NLVS hemmten als Kontrolle ebenfalls die β 1(i)- und β 5(i)-Untereinheiten.

Die murine Lymphom-Zellreihe EL-4 diente ohne Inhibitor wieder als Positivkontrolle - alle Untereinheiten werden als kräftige Banden zwischen 20 und 30 kDa angezeigt.

3.2.1.4 Darstellung von Bortezomib-induziertem ER-Stress mittels Antikörpern

Bortezomib inhibiert die β 1(i)- und β 5(i)-Untereinheiten des Proteasoms. Um zu verifizieren, ob durch Bortezomib wie vorher beschrieben darüber hinaus auch ER-Stress induziert wird, wurde mittels Western Blot die Expression der ERAD-/UPR-assoziierten Proteine CHOP und BiP unter Bortezomib bzw. (als positive Kontrolle) Tunicamycin nach unterschiedlichen Inkubationszeiten dargestellt.

Bortezomib führte ebenso wie Tunicamycin, bei längerer Inkubationszeit in zunehmendem Maße, zu ER-Stress in den THP-1-Zellen.

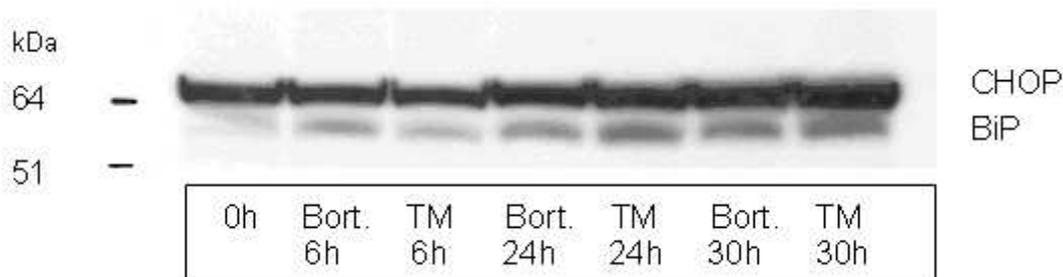


Abb. 3.6: Anti-CHOP/-BiP Western Blot mit Bortezomib u. Tunicamycin, zeitliche Kinetik. Zellen: THP-1, Bort. = Bortezomib (20 nM), TM = Tunicamycin (6 µg/ml)

Wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, wurde ein Western Blot gegen die UPR-assoziierten Proteine CHOP und BiP durchgeführt. Bortezomib führte ebenso wie die Kontrollsubstanz Tunicamycin mit zunehmender Inkubationszeit vermehrt zur Expressierung von CHOP und BiP als Hinweis auf ER-Stress.

3.2.2 Ritonavir

Es galt zu erfassen, inwiefern der eingangs vorgestellte HIV-Proteaseinhibitor Ritonavir das Wachstum der monozytären THP-1-Zellen beeinflusst.

3.2.2.1 CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay zur Darstellung der antiproliferativen Wirkung von Ritonavir auf THP-1-Zellen

In dieser Versuchsreihe wurde die Proliferation der THP-1-Zellen unter Einwirkung von Ritonavir in Konzentrationen zwischen 5 µM und 50 µM untersucht. In der klinischen Anwendung sind Plasmaspiegel zwischen 10 µM und 30 µM erreichbar.

Es zeigt sich, dass Ritonavir in steigender Konzentration zunehmend die Proliferation der THP-1-Zellen hemmte.

Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden betrug das Wachstum der THP-1-Zellen bezogen auf die Kontrollprobe (nur Medium und DMSO) unter Einfluss von 5 µM Ritonavir 72,20 % und sank bis auf 13,58 % unter 50 µM ab.

Nach einer 24-stündigen Inkubation mit 5 µM Ritonavir betrug die Proliferation verglichen mit der Kontrolle 76,36 %, unter 50 µM Ritonavir 15,31 %.

Entsprechend führte eine Inkubation mit 50 μM Ritonavir nach 48 Stunden zu einer Proliferation von nur noch 7,45 % und nach 72 Stunden zu 3,70 %.

Tabelle 3.3: Einfluss von Ritonavir auf die Proliferation der THP-1-Zellen

(Mittelwerte; 24 und 48 h Inkubation: n=4, 12 und 72 Stunden: n=1):

Ritonavir	0 μM	5 μM	10 μM	20 μM	30 μM	50 μM
12h Inkubation	100%	72,20%	73,31%	54,02%	38,07%	13,58%
24 h Inkubation	100%	76,36%	68,29%	58,77%	55,41%	15,31%
48 h Inkubation	100%	73,09%	64,83%	51,80%	33,98%	7,45%
72 h Inkubation	100%	88,00%	76,50%	57,96%	45,86%	3,70%

Tabelle 3.4: Standardabweichungen der gleichen Versuchsreihe (n=4)

Ritonavir	5 μM	10 μM	20 μM	30 μM	50 μM
24 h Inkubation	18,46%	12,77%	7,01%	12,36%	11,07%
48 h Inkubation	21,99%	29,91%	16,89%	-	1,60%

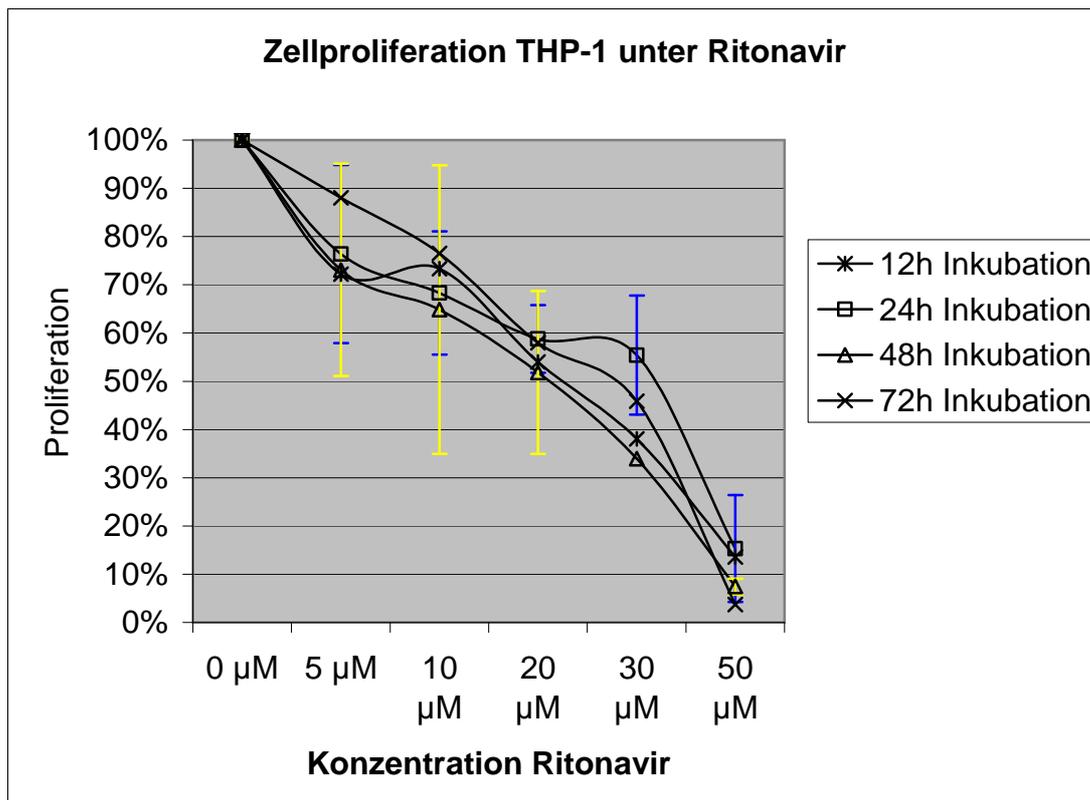


Abb. 3.7: Einfluss von Ritonavir auf die Proliferation der THP-1-Zellen.

THP-1-Zellen wurden über unterschiedlich lange Inkubationszeiten ansteigenden Konzentrationen von Ritonavir ausgesetzt (siehe Legende). Wie im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben, wurde anhand der photometrisch gemessenen Absorptionswerte mithilfe des MTS-Assays „CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ die Proliferation im Verhältnis zur Kontrolle ohne Inhibitor bestimmt.

Ritonavir hemmte in steigender Konzentration zunehmend die Proliferation der THP-1-Zellen.

3.2.2.2 Darstellung der aktiven Proteasomuntereinheiten in lebenden THP-1-Zellen mittels DALVS

Ritonavir hemmt, wie oben dargestellt, in zunehmender Konzentration das THP-1-Zellwachstum. Zur Darstellung der aktiven Proteasomuntereinheiten der mit Ritonavir behandelten intakten THP-1-Zellen wurde, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, nach 48-stündiger Inkubation mit steigenden Ritonavir-Konzentrationen ein *Active Site Labelling* (Aktivitätsmarkierung der katalytischen β -Untereinheiten) mittels Western Blot gegen die Dansylgruppe von DALVS (DansylAhx₃L₃VS) angefertigt. Es zeigt sich bei keiner der

verwendeten Konzentrationen bis 100 μM (die therapeutisch erreichbare Konzentration beträgt 30 μM) eine Hemmung der β -Untereinheiten.

Wie in Abb. 3.9 zu sehen ist, führte die Inkubation mit niedrigen Ritonavir-Dosen (2 und 5 μM) vielmehr zu einer gesteigerten Proteasomaktivität.

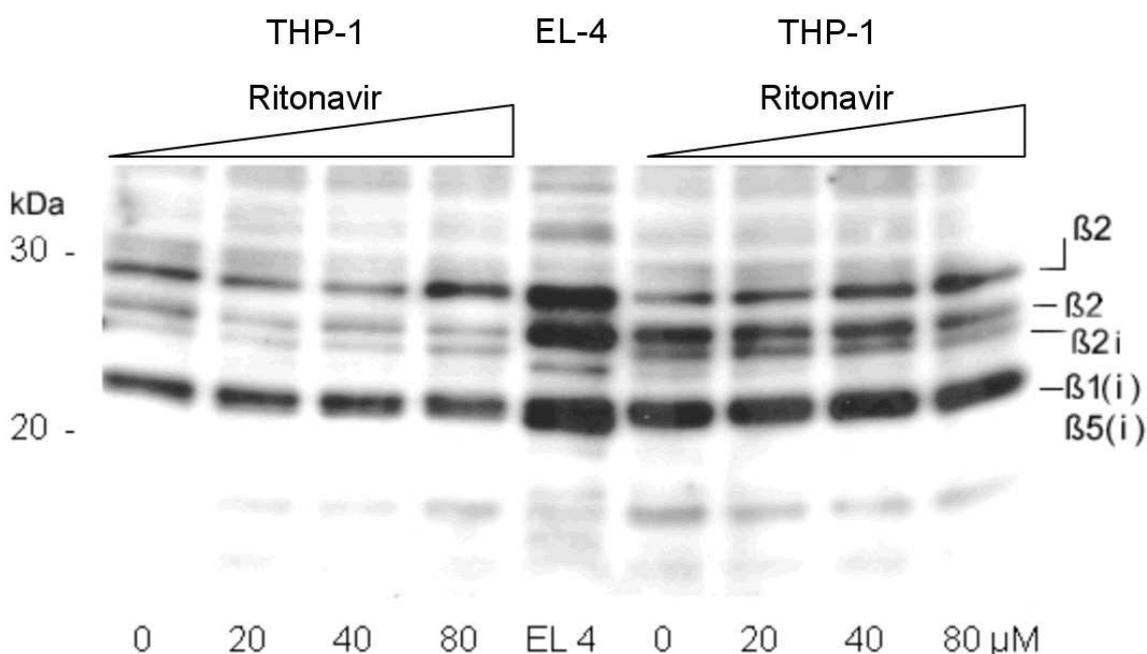


Abb. 3.8: Anti-DALVS Western Blot mit Ritonavir [μM], Zellen: THP-1, 48 Stunden Inkubation

Wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, wurden THP-1-Zellen für 48 Stunden den genannten Konzentrationen von Ritonavir ausgesetzt, daraufhin wurden die katalytischen Untereinheiten der intakten Zellen mittels DALVS markiert und ein Western Blot gegen Anti-DALVS angefertigt.

Als Kontrolle ohne Inhibitor diente hier die murine Lymphom-Zellreihe EL-4, welche in unserem Labor sowie von Kessler et al. hinsichtlich der Darstellung der β -Untereinheiten untersucht worden war und sowohl das konstitutive als auch das Immunoproteasom exprimiert.

Es ist zu sehen, dass Ritonavir in keiner der verwendeten Konzentrationen bis 100 μM eine Hemmung der β -Untereinheiten bewirkt.

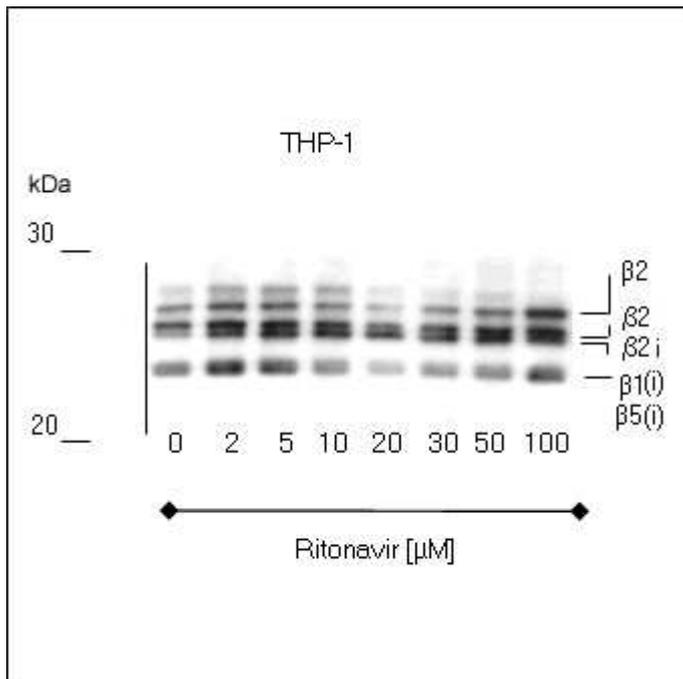


Abb. 3.9: Weiterer Anti-DALVS Western Blot von THP-1-Zellen unter Ritonavir-Einfluss. 48 Stunden Inkubation

Auch bei einer Konzentration von 100 μM , welche weit über der therapeutisch erreichbaren von 30 μM liegt, hemmte Ritonavir nicht die katalytischen β -Untereinheiten des Proteasoms. In niedrigen Dosierungen (2 und 5 μM) zeigt sich vielmehr eine gesteigerte Proteasomaktivität.

3.2.2.3 Darstellung der aktiven Proteasomuntereinheiten in lysierten THP-1-Zellen mittels BioALVS

Auch in diesem Western Blot gegen biotinyliertes AdaAhx₃L₃VS (AdaK(bio)Ahx₃L₃VS, BioALVS), welches nicht zellpermeabel ist und daher ein Lysieren der THP-1-Zellen erforderlich macht, ließ sich im Gegensatz zu der Kontrollprobe mit dem Proteasominhibitor NLVS (50 µM) auch bis zu einer Ritonavir-Dosis von 100 µM keine Aktivitätsminderung der katalytischen β-Untereinheiten verzeichnen.

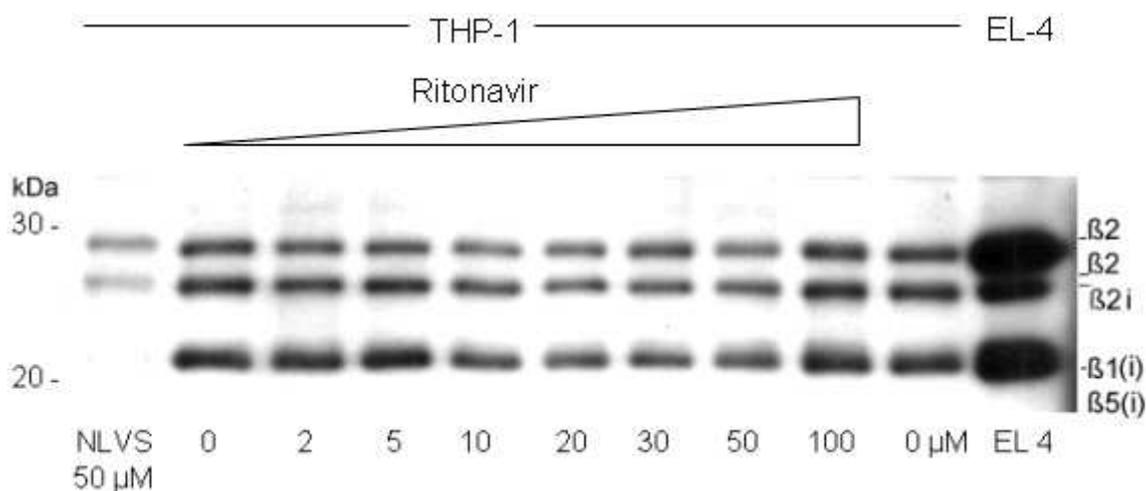


Abb. 3.10: Anti-AdaK(bio)Ahx₃L₃VS (BioALVS) Western Blot mit Ritonavir [µM].

Zellen: THP-1, Kontrollzellen: EL-4, Kontrollinhibitor: NLVS, 48 Stunden Inkubation

Dieser wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschriebene angefertigte BioALVS Western Blot stellt die aktiven Proteasomuntereinheiten lysierter THP-1-Zellen dar. Als Zellkontrolle diente erneut die Lymphom-Zellreihe EL-4. Auch hier zeigt sich keine Proteasominhibition durch Ritonavir. Zur Validierung der Methode wurde der Proteasominhibitor NLVS in einer Konzentration von 50 µM verwendet. Unter Einfluss von NLVS fehlen die Banden der β1(i)-/β5(i)-Untereinheiten bei 20 kDa aufgrund der Hemmung dieser Untereinheiten.

3.2.2.4 Darstellung von Ritonavir-induziertem ER-Stress mittels Antikörpern

Die vorangegangenen Versuche haben gezeigt, dass Ritonavir das Wachstum der THP-1-Zellen, nicht aber die katalytisch aktiven Untereinheiten des Proteasoms inhibiert. Dies steht in Widerspruch zu früheren Arbeiten, die

mittels indirekter Analyse der Proteasomaktivität (Messung des Umsatzes fluorogener Substrate) eine Inhibition des Proteasoms durch Ritonavir postulieren. Dazu passend zeigen diese Arbeiten auch die Induktion von ER-Stress durch die Ritonavir-Gabe, welche demnach am wahrscheinlichsten direkt durch die Proteasominhibition hervorgerufen würde. Es stellte sich also die Frage, ob Ritonavir nicht möglicherweise unabhängig von einer Inhibition des Proteasoms ER-Stress induzieren und den Zelltod verursachen kann.

In den hier dargestellten Western Blots lässt sich anhand der vermehrten Exprimierung der UPR-assoziierten Proteine BiP, CHOP und PDI eine Induktion von ER-Stress durch Ritonavir nachweisen.

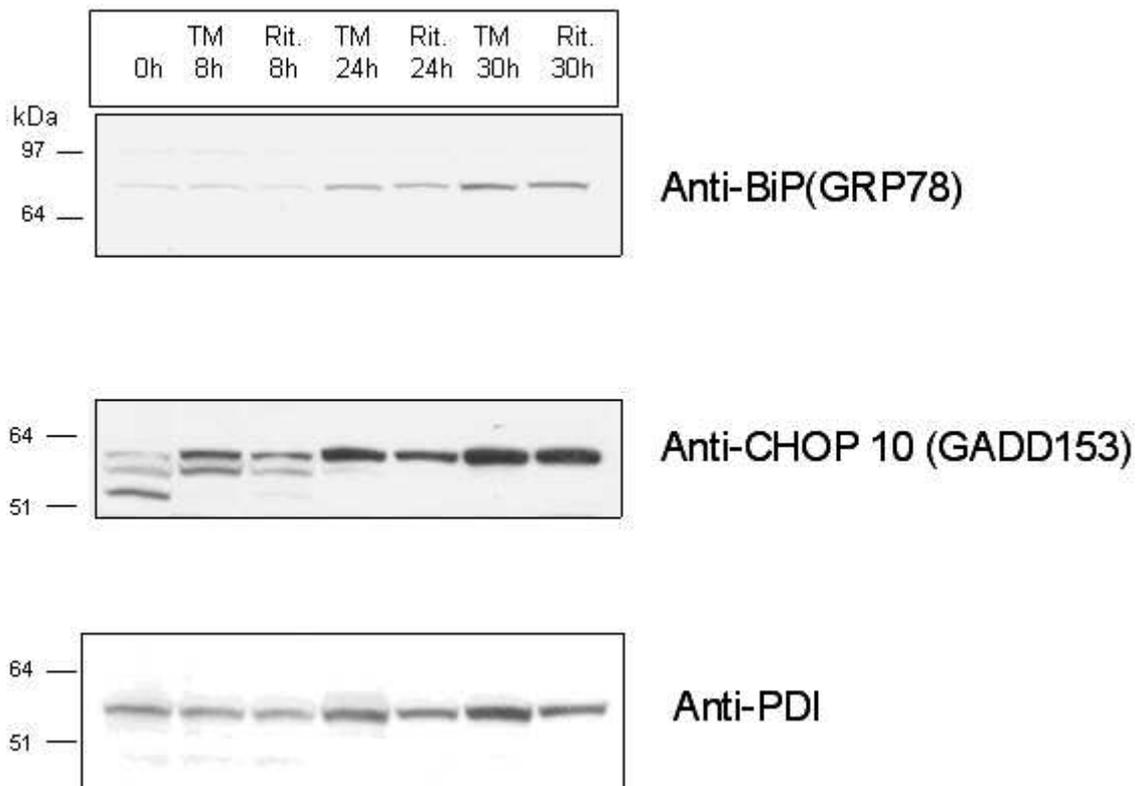


Abb. 3.11: Anti-BiP/-CHOP/-PDI Western Blot mit Ritonavir und Tunicamycin, zeitliche Kinetik. Zellen: THP-1, Rit. = Ritonavir (40 μ M), TM = Tunicamycin (6 μ g/ml)

In diesen Western Blots gegen die UPR-assoziierten Proteine BiP, CHOP und PDI (siehe auch Kapitel „Material und Methoden“) zeigt sich bei den THP-1-Zellen unter Ritonavir-Einwirkung unterschiedlicher Inkubationszeiten (0, 8, 24 und 30 Stunden) ein ähnliches

Ergebnis wie unter Einwirkung von Tunicamycin, welches als bekannter Induktor von ER-Stress als positive Kontrolle verwendet wurde:

Mit zunehmender Inkubationszeit wurden die UPR-assoziierten Proteine vermehrt exprimiert - Ritonavir löst ER-Stress aus.

3.3 Kombinationsversuche

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, inwiefern sich die jeweiligen Inhibitoren in Kombination hinsichtlich ihrer antiproliferativen Effekte beeinflussen.

Dazu wurden die THP-1-Zellen jeweils für 48 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen zweier Substanzen inkubiert und die Proliferationsrate mit der oben erläuterten CellTiter-Methode gemessen. Aus mindestens drei verschiedenen Versuchen wird ein repräsentativer gezeigt. Jede Probe wurde in dreifacher Ausführung getestet und der Mittelwert dargestellt.

3.3.1 Kombination von Ritonavir und Bortezomib

Ich konnte in den oben beschriebenen Experimenten zeigen, dass sowohl Ritonavir als auch Bortezomib einen inhibierenden Effekt auf das Wachstum der THP-1-Zellen haben.

Ritonavir führt nicht zur Proteasominhibition aber über ER-Stress zur Apoptose, Bortezomib hemmt das Proteasom und induziert darüber hinaus auch ER-Stress. Interessant war nun die Frage, ob sich mittels Kombination der Induktion von proteasomabhängigem ER-Stress (Bortezomib) und proteasom-unabhängigem ER-Stress (Ritonavir) eine synergistische Wirkung erzielen lässt.

3.3.1.1 CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay zur Darstellung der antiproliferativen Wirkung von Ritonavir und Bortezomib auf THP-1-Zellen

Mithilfe des gleichen MTS-Assays wurde der wachstumshemmende Effekt von Ritonavir und Bortezomib in Kombination dargestellt.

Bortezomib alleine senkte in der subtherapeutischen Konzentration von 5 nM die Proliferationsrate lediglich auf 95,99 % im Vergleich zur Kontrollprobe ohne Inhibitor. Ritonavir 5 μ M alleine reduzierte das Zellwachstum auf 79,81 %.

In Kombination beider Inhibitoren verringerte sich die Proliferationsrate bei den gleichen Konzentrationen auf 58,20 %.

Besonders deutlich wird hier die synergistische Wirkung der beiden Inhibitoren bei alleiniger Gabe versus Kombination der jeweils höchsten getesteten Dosis: Ritonavir allein in einer Konzentration von 10 μ M gegeben, senkte das Zellwachstum auf 70,10 %, Bortezomib alleine bewirkte bei 10 nM einen Rückgang auf 75,40 %. In Kombination dieser Dosen konnte das Wachstum der THP-1-Zellen auf 15,21 % reduziert werden.

Dies entspricht einer synergistischen Wirkung von Bortezomib und Ritonavir auf THP-1-AML-Zellen in vitro bei jeweils therapeutischem Plasmaspiegel dieser Medikamente.

In Abbildung 3.13 (normalisiertes Isobologramm) wird dies anhand des dargestellten *combination index* (CI) deutlich.

Tabelle 3.5: Einfluss von Ritonavir und Bortezomib auf die Proliferation der THP-1-Zellen (48 h Inkubation)

		Bortezomib			
		0 nM	0,5 nM	5 nM	10 nM
	0 μM	100,00%	97,63%	95,99%	75,40%
Ritonavir	0,5 μM	106,95%	102,81%	89,91%	76,64%
	1 μM	84,74%	84,77%	70,61%	50,30%
	5 μM	79,81%	73,68%	58,20%	27,55%
	10 μM	70,10%	66,47%	48,29%	15,21%

Effekt von Bortezomib und Ritonavir auf die THP-1 Proliferation, 48h Inkubation

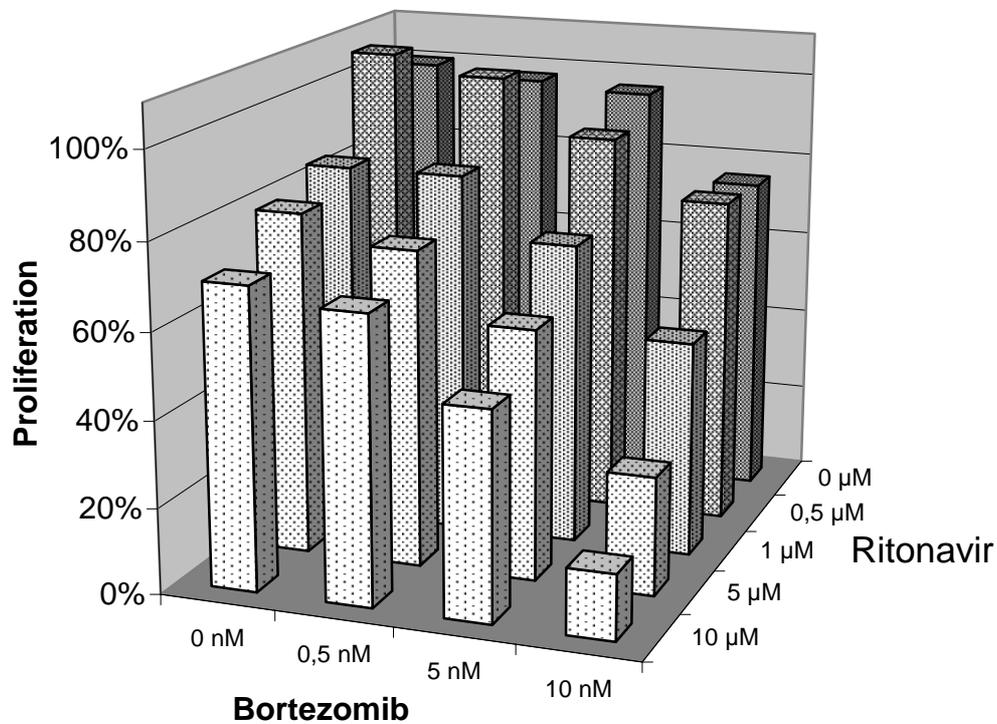


Abb. 3.12: Einfluss von Ritonavir und Bortezomib auf die Proliferation der THP-1-Zellen.

Wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, wurde mittels MTS-Assay die Proliferationsrate der getesteten Kombinationen unterschiedlicher Konzentrationen in Bezug auf die Probe ohne Inhibitor bestimmt. Jede Probe wurde in dreifacher Ausführung getestet und der entsprechende Mittelwert dargestellt.

Hier zeigt sich eine synergistische Wirkung von Bortezomib 10 nM und Ritonavir μM auf die THP-1-AML-Zellen. Es handelt sich jeweils um therapeutische Plasmaspiegel dieser Medikamente.

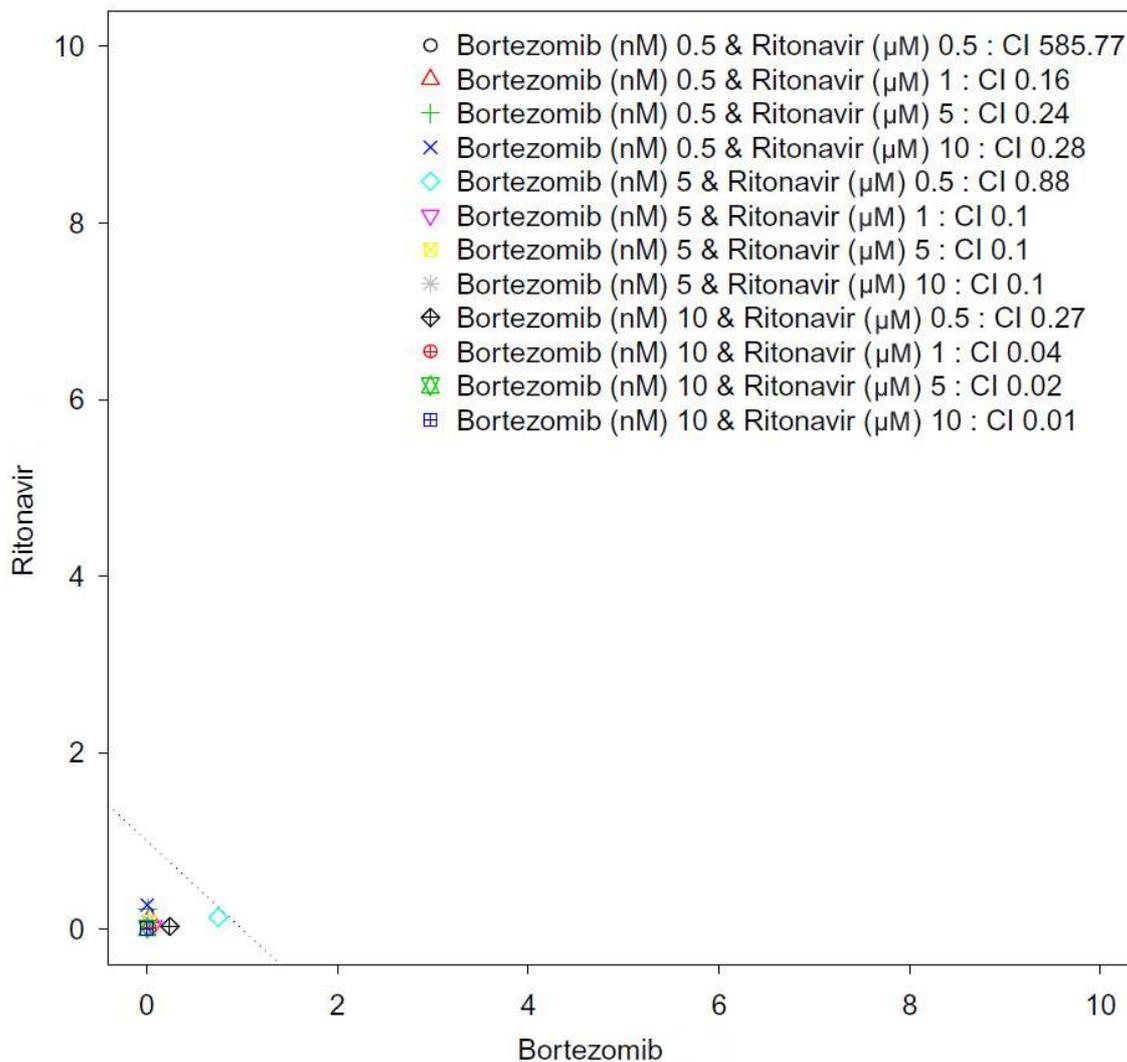


Abb. 3.13: Normalisiertes Isobologramm, Ritonavir und Bortezomib, Zellen: THP-1
 Alle kombinierten Inhibitor-Konzentrationen mit einem *combination index* (CI) < 1 (Datenpunkte entsprechend links und unterhalb der punktierten Linie) wirken synergistisch hinsichtlich der Proliferationshemmung. Nur die kleinste getestete Kombination, Bortezomib 0,5 nM mit Ritonavir 0,5 µM, wird als antagonistisch dargestellt (Proliferation von 102,81%, siehe Tabelle 3.5).

3.3.1.2 Darstellung der aktiven Proteasomuntereinheiten in lebenden THP-1-Zellen mittels DALVS

In dieser Versuchsreihe wurde mittels Anti-DALVS Western Blot (*Active Site Label*) zur Darstellung der katalytischen β -Untereinheiten der THP-1-Zellen getestet, inwiefern Bortezomib und Ritonavir einzeln sowie in Kombination das Proteasom hemmen.

Ritonavir alleine hemmte die Proteasomuntereinheiten wie oben gezeigt nicht. Bortezomib alleine hemmte ab einer Konzentration von 10 nM (Abb. 3.13) bzw. 20 nM (Abb. 3.14) die $\beta 1(i)$ - / $\beta 5(i)$ -Untereinheiten.

In Kombination beider Substanzen wurden diese Untereinheiten nicht zusätzlich inhibiert dargestellt.

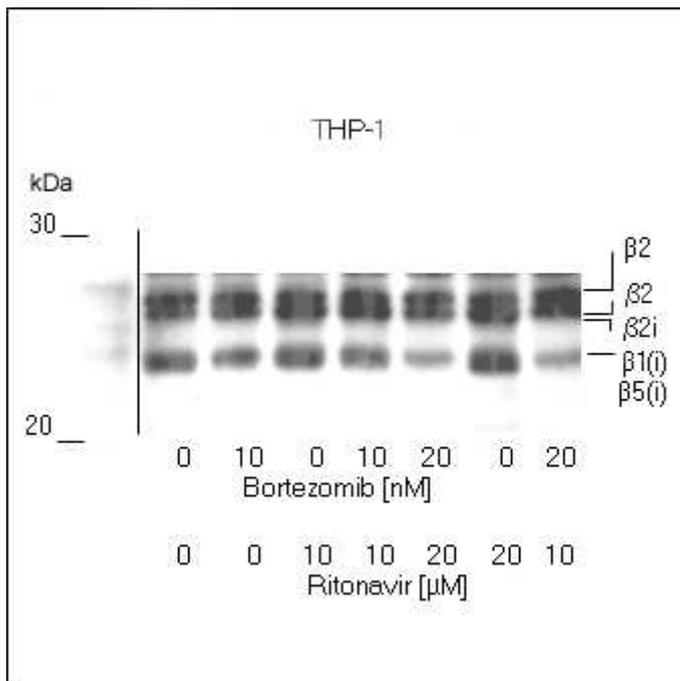


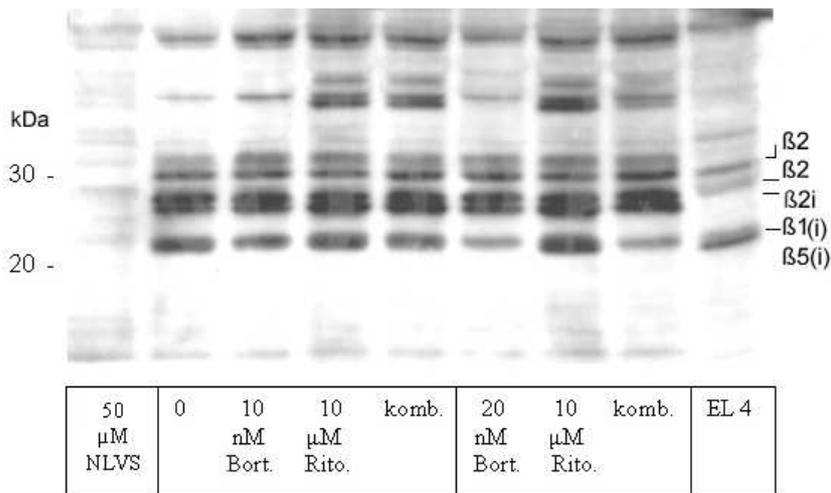
Abb. 3.14: Anti-DALVS Western Blot mit Bortezomib [nM] und Ritonavir [μM].

Zellen: THP-1, Kontrollzellen: EL-4, 48 Stunden Inkubation

Mithilfe dieses *Active Site Labels* konnten die aktiven Proteasomuntereinheiten intakter Zellen wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben dargestellt werden.

Es wird deutlich, dass Ritonavir alleine die Proteasomuntereinheiten wie oben beschrieben nicht hemmte. Bortezomib alleine hemmte ab einer Konzentration von 10 nM die $\beta 1(i)$ - / $\beta 5(i)$ -Untereinheiten. In der Kombination Bortezomib 10 nM / Ritonavir 10 μM werden diese Untereinheiten nicht zusätzlich inhibiert dargestellt.

Die Kombination aus Bortezomib 20 nM und Ritonavir 10 μM zeigt hier eine stärkere Hemmung, welche ähnlich stark war wie unter der Kombination von Bortezomib 20 nM mit Ritonavir 20 μM. Ritonavir 20 μM alleine führte zu keiner Proteasomhemmung.



**Abb. 3.15: weiterer Anti-DALVS Western Blot mit Bortezomib [nM] und Ritonavir [μM]
Zellen: THP-1, Kontrollzellen: EL-4**

Bortezomib hemmte hier in einer Konzentration von 20 nM sowohl alleine als auch in Kombination mit Ritonavir die katalytischen Proteasomuntereinheiten. Die zusätzliche Gabe von Ritonavir bewirkte keine stärkere Inhibition der Untereinheitsaktivitäten. Wie bei den Einzelversuchen dienten NLVS-exponierte THP-1-Zellen als Positivkontrolle, die murinen Lymphomzellen EL-4 als Negativkontrolle zur Proteasomdarstellung.

3.3.1.3 Darstellung der aktiven Proteasomuntereinheiten in lysierten THP-1-Zellen mittels BioALVS

In dem daraufhin angefertigten Anti-AdaK(bio)Ahx3L3VS Western Blot wird ebenfalls kein Synergismus von Bortezomib und Ritonavir bezüglich der Proteasominhibition im Zelllysat sichtbar.

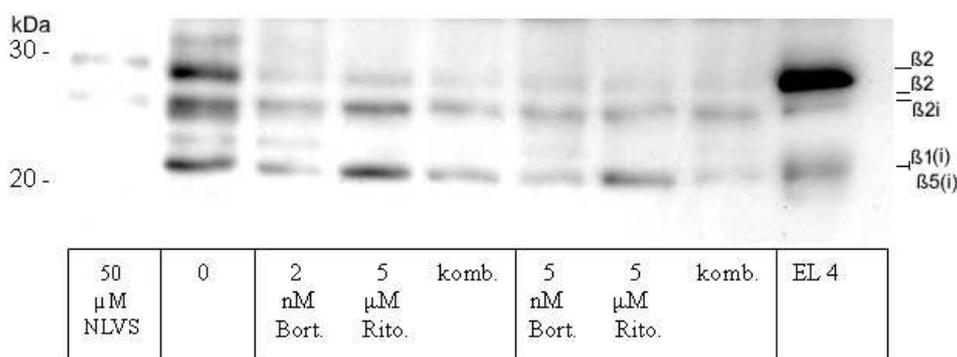


Abb. 3.16 a): Anti-AdaK(bio)Ahx₃L₃VS (BioALVS) Western Blot mit Bortezomib [nM] und Ritonavir [μM], Zellen: THP-1, Kontrollzellen: EL-4, Kontrollinhibitor: NLVS

In diesem Anti-AdaK(bio)Ahx₃L₃VS Western Blot zur Darstellung der katalytischen β-Untereinheiten des Proteasoms lysierter THP-1-Zellen wird ebenfalls kein Synergismus von Bortezomib und Ritonavir bezüglich der Proteasominhibition sichtbar. Bortezomib hemmte hier schon ab der subtherapeutischen Konzentration von 2 nM die Proteasomuntereinheiten. Diese Konzentration bzw. 5 nM kombiniert mit Ritonavir 5 μM hatten ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die β1(i)- / β5(i)-Untereinheiten, welcher aber nicht über den von Bortezomib alleine hinausging.

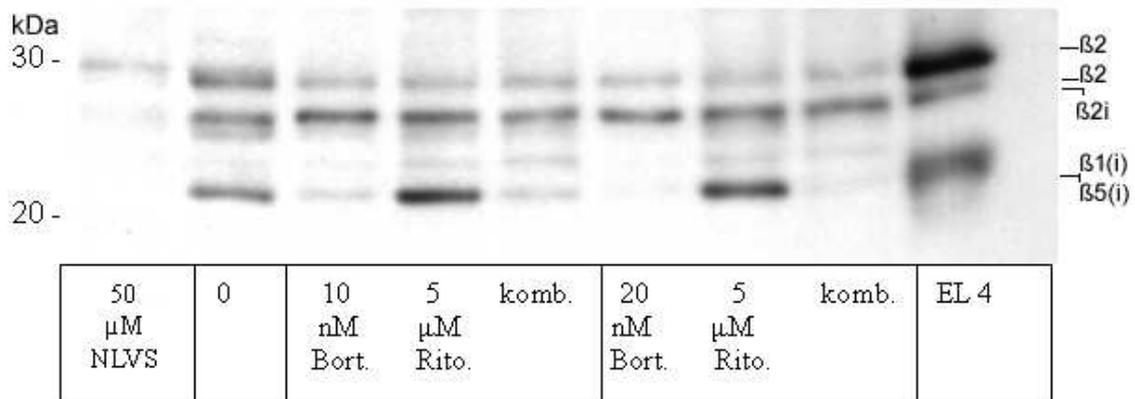


Abb. 3.16 b): Anti-AdaK(bio)Ahx₃L₃VS (BioALVS) Western Blot mit Bortezomib [nM] und Ritonavir [μM], Zellen: THP-1, Kontrollzellen: EL-4, Kontrollinhibitor: NLVS

In der niedrigsten therapeutischen Konzentration von 10 nM zeigt Bortezomib eine Inhibition der β1(i)- / β5(i)-Untereinheiten, deutlicher trat dieser Effekt bei 20 nM auf.

In Kombination mit Ritonavir kam es auch hier nicht zu einer zusätzlichen Hemmung.

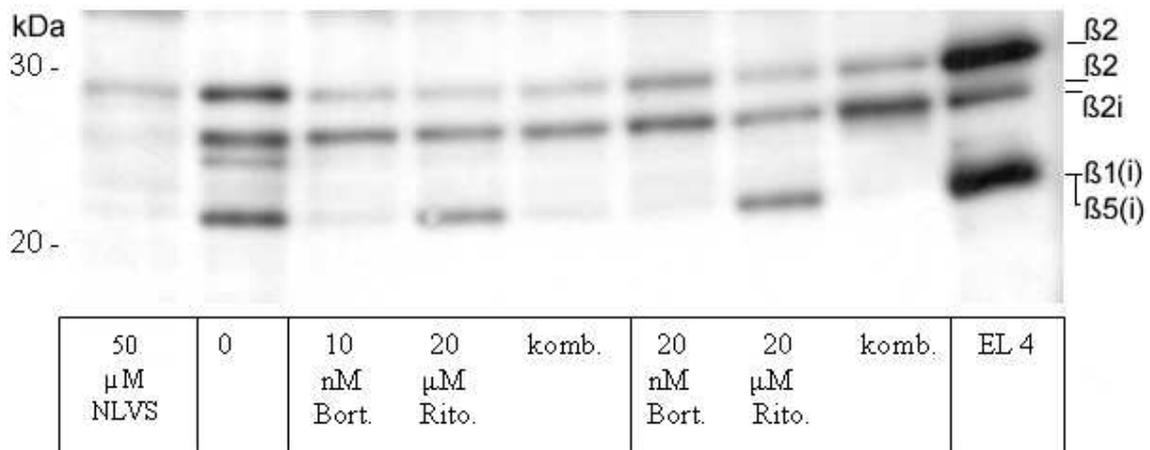


Abb. 3.16 c): Anti-AdaK(bio)Ahx₃L₃VS (BioALVS) Western Blot mit Bortezomib [nM] und Ritonavir [μM], Zellen: THP-1, Kontrollzellen: EL-4, Kontrollinhibitor: NLVS

Auch bei diesen Konzentrationen bewirkte Ritonavir in Kombination mit Bortezomib keine zusätzliche Aktivitätsinhibition der Proteasomuntereinheiten.

3.3.1.4 Darstellung von Bortezomib- und Ritonavir-induziertem ER-Stress mittels Anti-CHOP-Antikörper

Hier wurde die Beeinflussung der einzelnen sowie kombinierten Wirkstoffe Bortezomib und Ritonavir hinsichtlich der Auslösung von ER-Stress anhand der Expressierung des Proteins CHOP untersucht. In der Kombination zeigt sich ein zumindest additiver Effekt beider Substanzen.

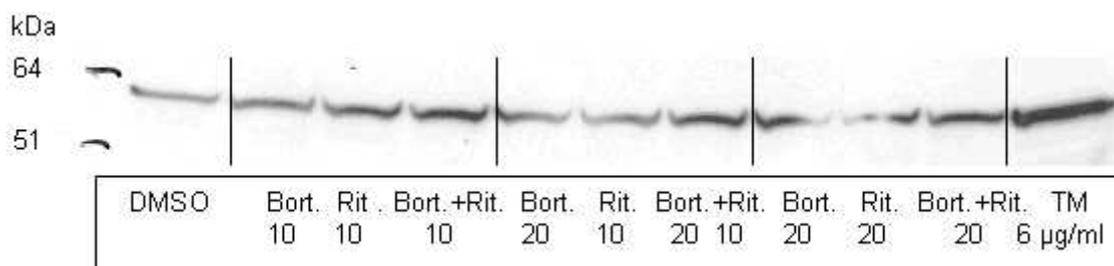


Abb. 3.17: Anti-CHOP Western Blot mit Bortezomib und Ritonavir
Zellen: THP-1, Bort. = Bortezomib [nM], Rit. = Ritonavir [µM], TM = Tunicamycin
DMSO = Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel von Bortezomib und Ritonavir)

In diesem Western Blot mit Darstellung der CHOP-Induktion unter Einfluss von Bortezomib, Ritonavir sowie beiden Wirkstoffen zusammen im zeitlichen Verlauf zeigt sich in der Kombination ein zumindest additiver Effekt.

Bortezomib alleine führte nach 10 bzw. 20 Stunden Inkubation mit den THP-1-Zellen zu einer mäßig ausgeprägten CHOP-Expression, ebenso Ritonavir.

Die Kombination beider bewirkte eine deutlich gesteigerte CHOP-Expression.

Auch in diesem Versuch wurde der bekannte ER-Stress-Induktor Tunicamycin als positive Kontrolle verwendet.

Das THP-1-Zelllysate lediglich mit DMSO diente als negative Kontrolle zur Darstellung der CHOP-Expression ohne Inhibitor.

3.3.1.5 CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay zur Darstellung der antiproliferativen Wirkung von Ritonavir und Bortezomib auf primäre AML-Blasten von Patienten

Die folgenden Versuche befassten sich mit der antiproliferativen Wirkung von Bortezomib und Ritonavir auf primäre AML-Blasten, welche von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie („Patient 1“, „Patient 2“ und „Patient 3“) der Medizinischen Klinik II der Eberhard Karls Universität Tübingen aus peripherem Blut gewonnen und wie in „Material und Methoden“ beschrieben bearbeitet wurden. Die Messungen erfolgten (wie bei den oben erläuterten Versuchen mit den THP-1-Zelllinie) mittels „CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell

Proliferation Assay“ nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden. Es wurden hierbei allerdings je Well 50.000 Zellen verwendet.

3.3.1.5.1 Patient 1

In diesem Versuch wurde Bortezomib in den Konzentrationen 5 nM, 10 nM, 20 nM und 40 nM sowie Ritonavir in den Konzentrationen 20 µM und 40 µM getestet - jeweils alleine und in Kombination.

Ab einer Bortezomib-Konzentration von 10 nM - ohne Ritonavir - nahm die Zellproliferation mit steigender Konzentration stetig ab. 5 nM Bortezomib hatten noch keinen antiproliferativen Effekt - es zeigt sich hier sogar vielmehr ein gesteigertes Wachstum.

Unter alleinigem Ritonavir-Einfluss zeigt sich bei 20 µM eine deutliche Proliferationshemmung.

In der Kombination aus Bortezomib 5 nM und Ritonavir 20 µM ist gegenüber Ritonavir alleine in derselben Dosis ein weiterer Wachstumsrückgang zu beobachten, der mit steigenden Dosierungen ausgeprägter wurde. Dies könnte für einen Synergismus von Bortezomib und Ritonavir sprechen, da eine subtherapeutische Bortezomib-Dosis, welche alleine verwendet zu keiner Wachstumshemmung führte, die Ritonavir-Wirkung verstärkte. Allerdings ist die Wirkung hier aufgrund der sehr starken Proliferationshemmung durch Ritonavir alleine schwer zu erfassen.

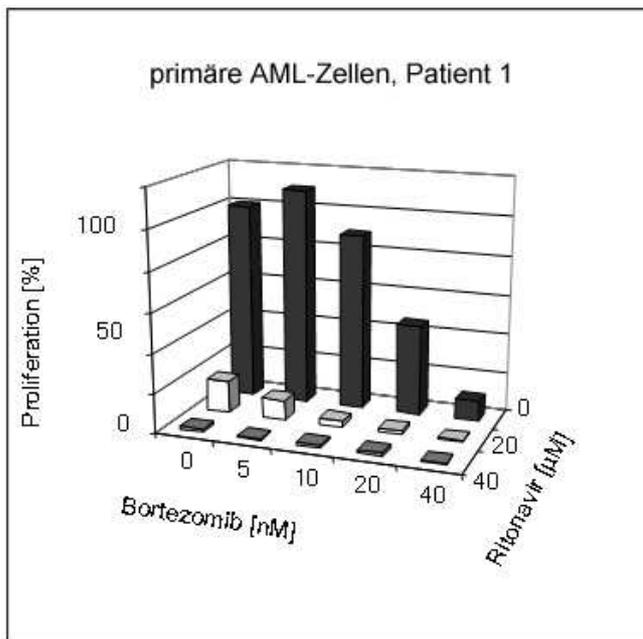


Abb. 3.18: Einfluss von Ritonavir und Bortezomib auf die Proliferation der primären AML-Blasten von Patient 1. MTS-Assay, 48 Stunden Inkubation

Entsprechen den oben erläuterten Kombinationsversuchen wurde hier mittels MTS-Assay „CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ die Proliferation der primären AML-Blasten von Patient 1 in Bezug auf die Kontrollprobe ohne Inhibitor ermittelt. Ab einer Bortezomib-Konzentration von 10 nM - ohne Ritonavir - nahm die Zellproliferation mit steigender Konzentration stetig ab. 5 nM Bortezomib hatten noch keinen antiproliferativen Effekt - es zeigt sich hier sogar vielmehr ein gesteigertes Wachstum.

Unter alleinigem Ritonavir-Einfluss zeigt sich bei 20 µM eine deutliche Proliferationshemmung. Die Kombination Bortezomib 5 nM / Ritonavir 20 µM lässt einen weiteren Wachstumsrückgang erkennen (ausgeprägter bei steigenden Dosierungen). Dies könnte für einen Synergismus von Bortezomib und Ritonavir sprechen, da eine subtherapeutische Bortezomib-Dosis (5 nM), welche alleine verwendet zu keiner Wachstumshemmung führte, die Ritonavir-Wirkung verstärkte. Die Wirkung ist hier aufgrund der sehr starken Proliferationshemmung durch Ritonavir alleine schwer zu erfassen.

3.3.1.5.2 Patient 2

Hier wurden die gleichen Bortezomib-Konzentrationen wie in dem vorstehenden Versuch verwendet. Der Kombinationspartner Ritonavir wurde hingegen in geringeren Konzentrationen (5 µM und 10 µM) getestet.

Bortezomib alleine hatte einen ähnlichen Effekt wie bei den Zellen von Patient 1, allerdings mit einer ausgeprägteren Proliferationshemmung bei 20 nM. Ritonavir alleine zeigte hier ab 10 µM eine Hemmwirkung.

In Kombination dieser Dosis mit einer Bortezomib-Konzentration von 5 nM zeigt sich kein weiterer Rückgang des Zellwachstums. Auch die subtherapeutische Dosis von 5 µM Ritonavir hatte allein oder in Kombination mit Bortezomib 20 nM und 40 nM nur einen schwachen Effekt.

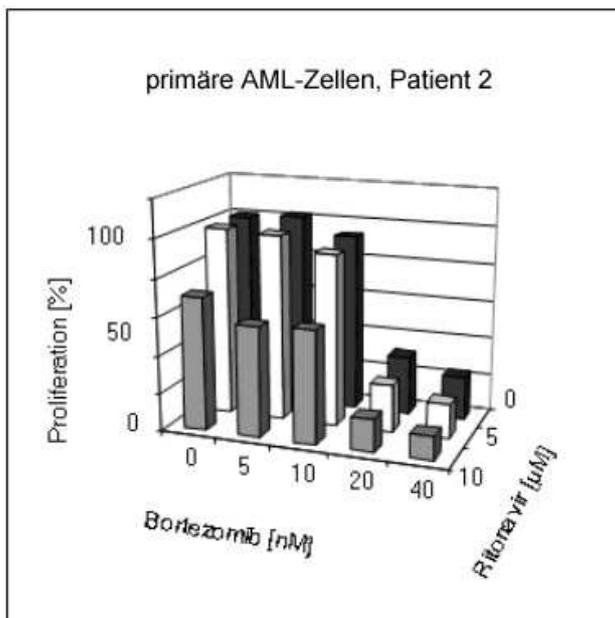


Abb. 3.19: Einfluss von Ritonavir und Bortezomib auf die Proliferation der primären AML-Blasten von Patient 2. MTS-Assay, 48 Stunden Inkubation

Im Vergleich zu dem entsprechenden Versuch mit Zellen des Patienten 1 zeigt sich hier eine ausgeprägtere Proliferationshemmung bei einer Bortezomib-Konzentration von 20 nM.

Ritonavir alleine zeigte hier ab 10 µM eine Hemmwirkung. Die Kombination dieser von Ritonavir 10 µM mit Bortezomib 5 nM bewirkte keinen weiteren Rückgang des Zellwachstums. Die subtherapeutische Dosis von 5 µM Ritonavir hatte allein oder in Kombination mit Bortezomib 20 nM und 40 nM nur einen schwachen Effekt.

3.3.1.5.2.1 Darstellung der aktiven Proteasomuntereinheiten in lebenden primären AML-Blasten von Patient 2 mittels DALVS

Bei diesen primären AML-Zellen hemmte Bortezomib ab 10 nM die katalytischen $\beta 1(i)$ - / $\beta 5(i)$ -Untereinheiten des Proteasoms. Ritonavir hingegen hatte auch in einer hohen Dosis von 40 µM keinen inhibitorischen Effekt auf die Proteasomaktivität.

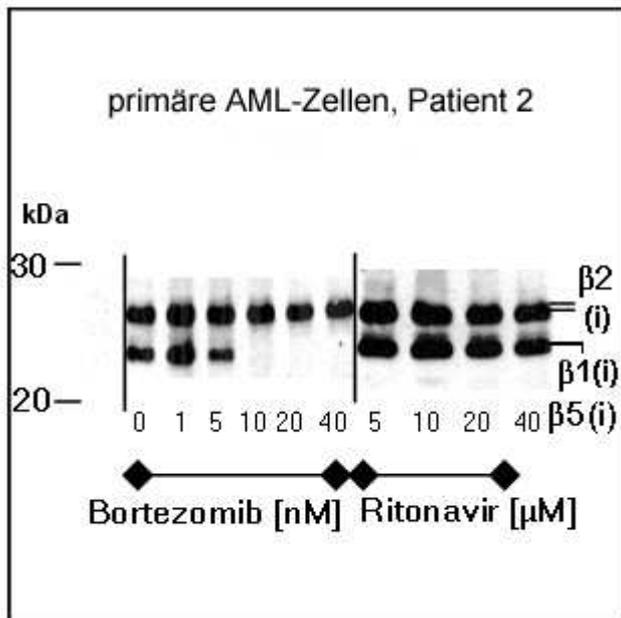


Abb. 3.20: Anti-DALVS Western Blot mit Bortezomib [nM] und Ritonavir [μM]. Zellen: primäre AML-Blasten von Patient 2

Wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, wurden in diesem *Active Site Label* mittels DALVS die katalytischen Untereinheiten der intakten Patientenzellen markiert und folgend ein Western Blot gegen Anti-DALVS angefertigt.

Hier hemmte Bortezomib ab 10 nM die katalytischen $\beta 1(i)$ -/ $\beta 5(i)$ -Untereinheiten des Proteasoms. Ritonavir führte auch in der höchsten getesteten Dosis von 40 μ M zu keiner Hemmung der Proteasomaktivität.

3.3.1.5.3 Patient 3

In diesem Versuch mit primären AML-Zellen von Patient 3 wurden bei den gleichen, ansteigenden Bortezomib-Konzentrationen wie in den vorherigen Versuchen Ritonavir-Konzentrationen von 10 μ M, 20 μ M und 40 μ M verwendet. Auch hier zeigt sich eine deutliche Wirkung des Ritonavirs ab 10 μ M.

Bortezomib weist schon ab 5 nM eine leichte antiproliferative Wirkung auf, welche in den hohen Konzentrationen allerdings nicht so ausgeprägt wie bei den vorher untersuchten Patientenzellen war. Demgegenüber war die Ritonavir-Wirkung im Vergleich zu den Voruntersuchungen stärker.

Bei diesen Zellen lässt sich kein Synergismus bezüglich der Zytotoxizität zwischen Bortezomib und Ritonavir ersehen.

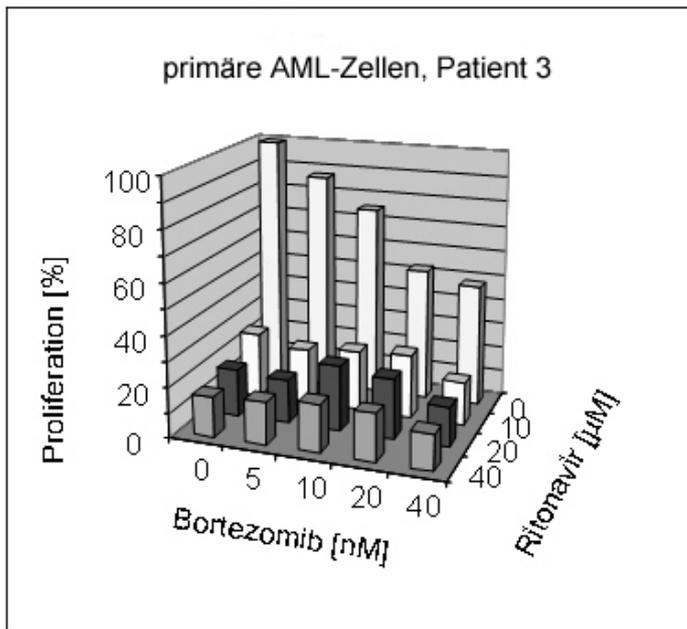


Abb. 3.21: Einfluss von Ritonavir und Bortezomib auf die Proliferation der primären AML-Blasten von Patient 3. 48 h Inkubation

MTS-Assay wie oben beschrieben. Schon ab einer Konzentration von 5 nM wirkte Bortezomib leicht antiproliferativ - in hohen Konzentrationen allerdings nicht so ausgeprägt wie bei den anderen gezeigten Patientenzellen. Demgegenüber war die Ritonavir-Wirkung im Vergleich zu den Voruntersuchungen stärker. Hier besteht kein Anhalt für einen Synergismus zwischen Bortezomib und Ritonavir.

3.3.2 Kombinationsversuche zur THP-1-Zellproliferation unter der Kombination von Ritonavir mit anderen Inhibitoren

Interessant waren neben der Kombination von Ritonavir und Bortezomib auch, inwiefern andere Substanzen jeweils in Kombination mit diesen das Wachstumsverhalten der THP-1-Zellen beeinflussen.

Hierfür kam erneut das MTS-Assay *CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* zur Anwendung.

3.3.2.1 Ritonavir und Valproat

Das als Antiepileptikum zugelassene Valproat ist als Histondeacetylaseinhibitor Gegenstand der hämato-onkologischen Forschung und erschien damit (neben den beiden Histondeacetylaseinhibitoren HDACi I und II) ein interessanter Kombinationspartner für die hier hauptsächlich behandelten Substanzen Ritonavir bzw. Bortezomib.

Ein Synergismus in der proliferationshemmenden Wirkung beider Inhibitoren lässt sich nicht erkennen.

Tabelle 3.6: Einfluss von Ritonavir und Valproat auf die Proliferation der THP-1-Zellen
(48 h Inkubation)

		Ritonavir				
		0 μ M	2 μ M	5 μ M	10 μ M	20 μ M
	0 mg/ml	100,00%	72,21%	96,43%	67,91%	51,27%
Valproat	2 mg/ml	98,14%	93,86%	92,92%	73,20%	58,38%
	5 mg/ml	93,21%	91,64%	96,88%	76,08%	60,50%
	10 mg/ml	95,88%	91,59%	96,88%	70,47%	55,91%
	20 mg/ml	95,82%	76,71%	71,11%	59,60%	52,01%

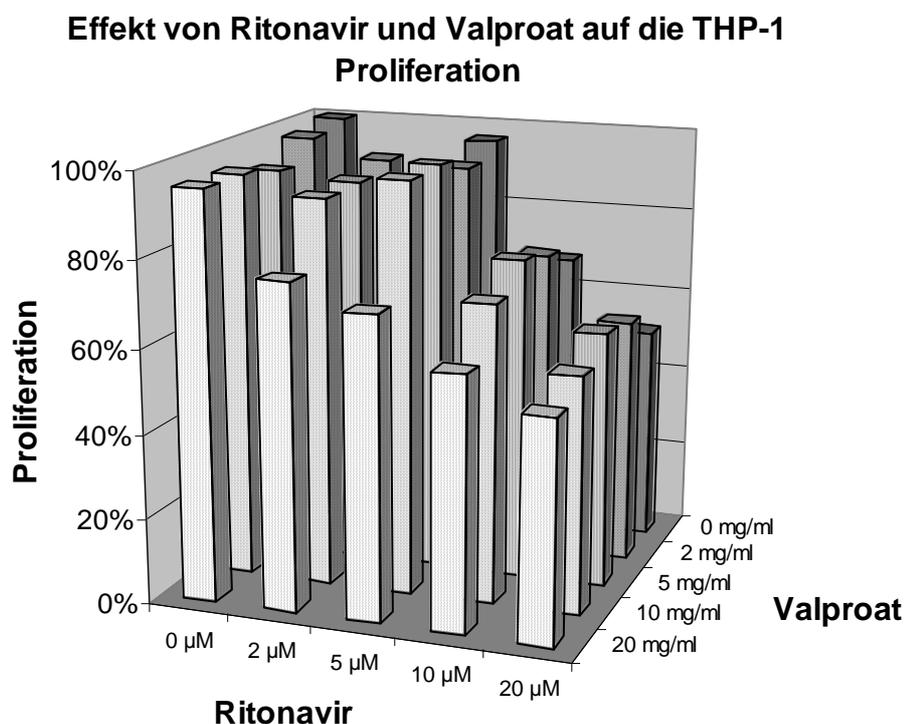


Abb. 3.22: Einfluss von Ritonavir und Valproat auf die Proliferation der THP-1-Zellen.
48 h Inkubation

Valproat senkte in dieser Versuchsreihe (MTS-Assay wie oben beschrieben) in der höchsten getesteten Konzentration von 20 mg/ml die Proliferationsrate geringfügig auf 95,82 %.

Auffallend ist hier, dass sich zu den geringeren Dosen kein signifikanter Unterschied zeigt.

5 μ M Ritonavir reduzierten das Zellwachstum hier auf 96,43 % im Vergleich zur Kontrollprobe.

In Kombination beider Inhibitoren verringerte sich die Proliferationsrate bei den gleichen Konzentrationen auf 71,11 %. Erst in Kombination mit der höchsten Valproat-Konzentration von 20 mg/ml gab es im Vergleich zur alleinigen Ritonavir-Gabe bis 10 μ M eine Verstärkung der wachstumshemmenden Wirkung. Bei 20 μ M Ritonavir wurden hingegen ohne Korrelation zu der Valproat-Dosis Wachstumsraten von 51,27% (ohne Valproat) bis 60,50% (5 mg/ml Valproat) gemessen.

3.3.2.2 Ritonavir und HDACi I

Mithilfe der gleichen Methode wurde der Effekt von Ritonavir kombiniert mit dem Histondeacetylaseinhibitor HDACi I auf das THP-1-Wachstum getestet.

Die statistische Auswertung der unten aufgeführten Daten mittels normalisiertem Isobologramm (siehe Kapitel 2, „Material und Methoden“) impliziert eine synergistische Wirkung unter folgenden Kombinationen bei insgesamt allerdings inkonsistentem Ergebnis, so dass nicht auf einen Synergismus gefolgert werden kann:

Ritonavir 2 μM mit HDACi I 30 nM, Ritonavir 5 μM mit HDACi I 30 nM, Ritonavir 5 μM mit HDACi I 100 nM, Ritonavir 10 μM mit HDACi I 30-300 nM, Ritonavir 20 μM mit HDACi I 30-3000 nM.

Tabelle 3.7: Einfluss von Ritonavir und HDACi I auf die Proliferation der THP-1-Zellen

(48 h Inkubation)

		Ritonavir				
		0 μM	2 μM	5 μM	10 μM	20 μM
	0 nM	100,00%	106,00%	87,89%	80,03%	59,61%
HDACi I	30 nM	69,23%	83,54%	60,37%	79,41%	44,75%
	100 nM	74,00%	85,47%	66,62%	76,22%	44,31%
	300 nM	73,25%	94,02%	78,81%	63,22%	44,92%
	1 μM	62,75%	84,84%	66,66%	62,87%	38,62%
	3 μM	52,29%	70,90%	60,26%	60,00%	37,96%

Effekt von Ritonavir und HDACi I auf die THP-1 Proliferation

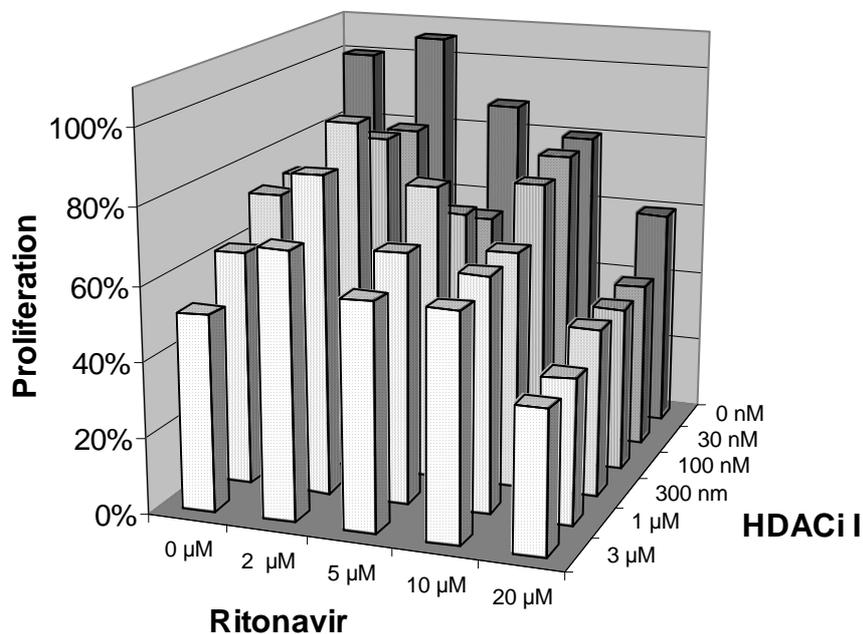


Abb. 3.23: Einfluss von Ritonavir und HDACi I auf die Proliferation der THP-1-Zellen. 48 h Inkubation

Der Histondeacetylaseinhibitor I (HDACi I) hemmte in diesem Kombinationsversuch (MTS-Assay wie oben beschrieben) alleine das Zellwachstum ab einer Konzentration von 30 nM. Ritonavir zeigte ab 5 µM eine antiproliferative Wirkung.

HDACi I senkte in der hier höchsten Konzentration von 3 µM die Proliferationsrate auf 52,29%, 20 µM Ritonavir auf 59,61%. In Kombination beider Inhibitoren dieser Konzentrationen betrug die Proliferationsrate 37,96%.

In den mittleren verwendeten HDACi I-Konzentrationen (30-300 nM) zeigt sich zusammen mit Ritonavir kein Unterschied in der Hemmwirkung (bei 20 µM Ritonavir jeweils um 44%).

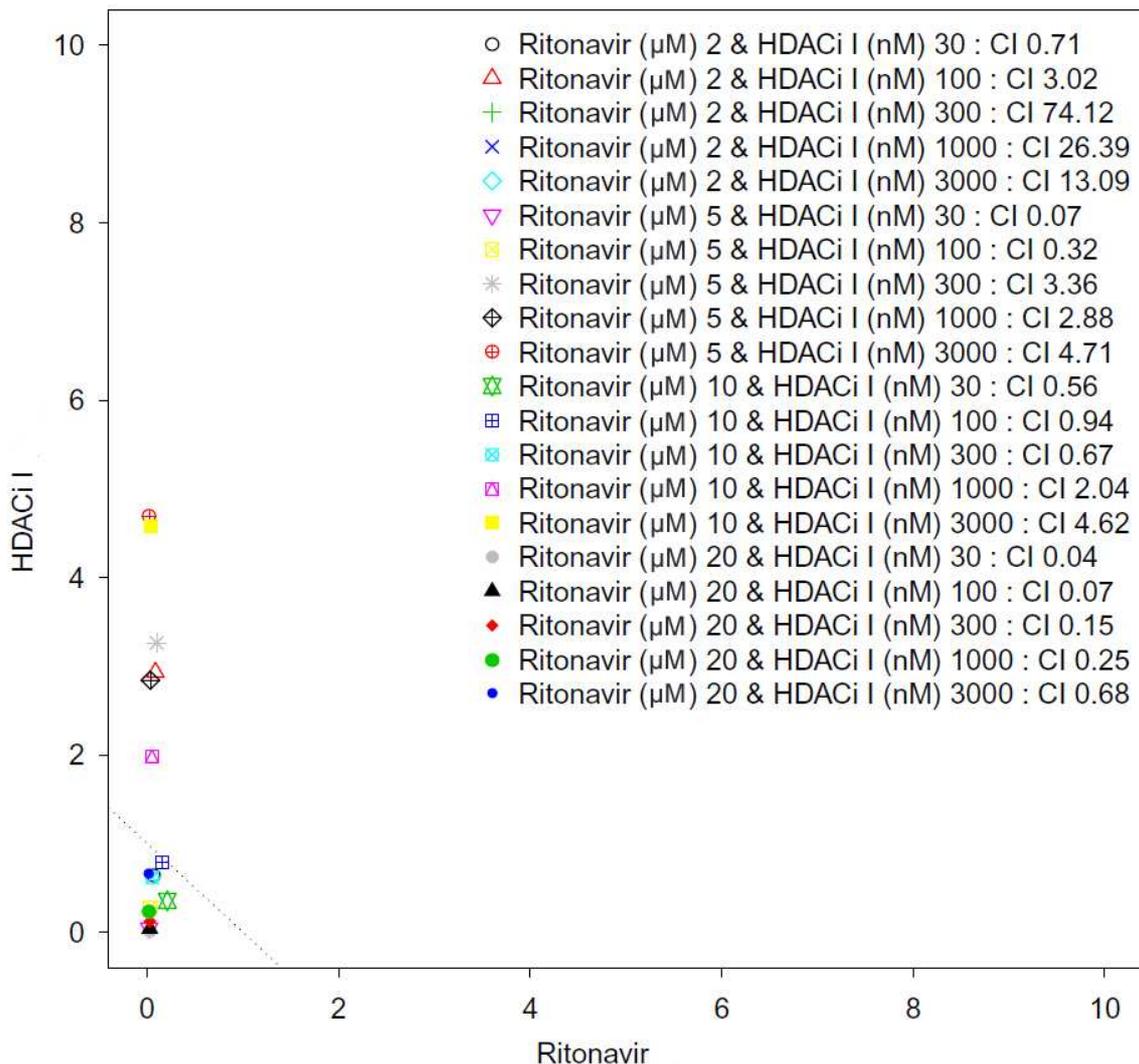


Abb. 3.24: Normalisiertes Isobologramm. Zellen: THP-1

Alle kombinierten Inhibitor-Konzentrationen mit einem *combination index* (CI) < 1 (Datenpunkte entsprechend links und unterhalb der punktierten Linie) wirken synergistisch hinsichtlich der Proliferationshemmung. Demnach zeigt sich ein Synergismus bei folgenden Kombinationen: Ritonavir 2 µM mit HDACi I 30 nM, Ritonavir 5 µM mit HDACi I 30 nM bzw. 100 nM, Ritonavir 10 µM mit HDACi I 30-300 nM, Ritonavir 20 µM mit HDACi I 30-3000 nM.

Ein CI über 1 (Datenpunkte rechts und oberhalb der punktierten Linie) spricht für einen Antagonismus.

Somit implizieren hier einzelne Datenpunkte einen Synergismus, dies stellt jedoch kein konsistentes Ergebnis dar, weshalb ein Synergismus für Ritonavir und HDACi I nicht konklusiv gezeigt werden kann.

3.3.2.3 Ritonavir und HDACi II

Zwischen Ritonavir und HDACi II ließ sich kein Synergismus in der proliferationshemmenden Wirkung erkennen.

Tabelle 3.8: Einfluss von Ritonavir und HDACi II auf die Proliferation der THP-1-Zellen
(48 h Inkubation)

		Ritonavir				
		0 μM	2 μM	5 μM	10 μM	20 μM
	0 nM	100,00%	86,14%	84,13%	83,40%	63,84%
HDACi II	30 nM	87,85%	82,76%	87,64%	86,40%	70,46%
	100 nM	95,08%	98,33%	89,40%	85,67%	78,47%
	300 nM	98,80%	110,01%	89,56%	80,47%	75,43%
	1 μM	86,14%	104,48%	88,99%	74,46%	72,99%
	3 μM	82,16%	100,27%	73,09%	84,35%	61,60%

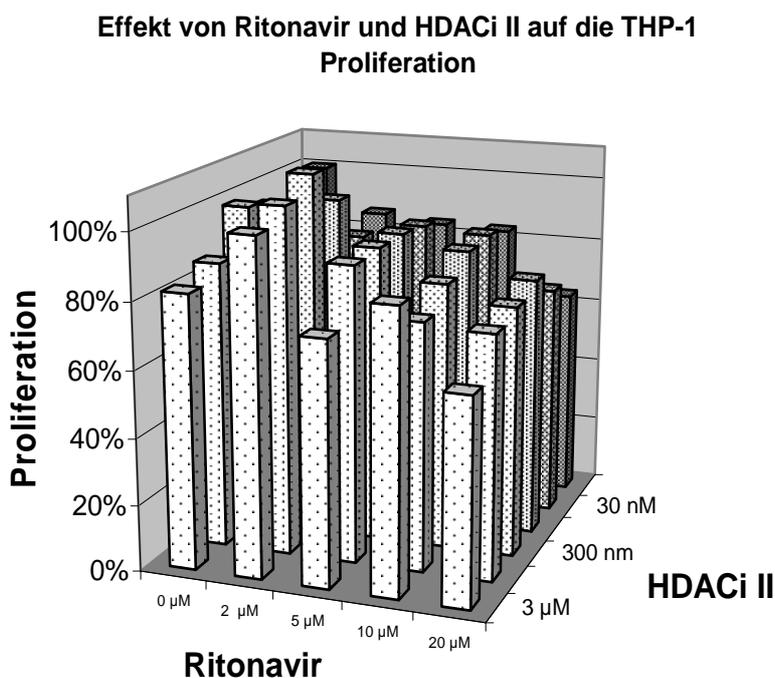


Abb. 3.25: Einfluss von Ritonavir und HDACi II auf die Proliferation der THP-1-Zellen.
48 h Inkubation

MTS-Assay wie oben beschrieben. HDACi II alleine senkte in einer Konzentration von 3 μM die Proliferationsrate auf 82,16%, Ritonavir in der getesteten Höchstdosis von 20 μM hier auf 63,84%. Die Kombination beider Inhibitoren in diesen Dosen bewirkte einen Rückgang der Proliferationsrate auf 61,60%. Wie in der Versuchsreihe mit HDACi I (siehe oben) fällt im mittleren Konzentrationsbereich des HDACi II (30-300 nM) auf, dass es keine Verbesserung der Hemmwirkung des Ritonavir zu bringen schien. So bewirkten 20 μM Ritonavir kombiniert mit 30 nM HDACi II eine Wachstumsrate von 70,46%, 100 nM hingegen noch 78,47%.

3.3.2.4 Ritonavir und Daunorubicin

Das in der Leukämie-therapie etablierte Anthrazyklin Daunorubicin schien in Kombination mit Ritonavir in folgenden Kombinationen synergistisch auf die Wachstumshemmung der THP-1-Zellen zu wirken (Auswertung mittels normalisiertem Isobologramm - siehe Kapitel 2, „Material und Methoden“), allerdings ist auch hier das Ergebnis nicht konsistent:

Ritonavir 2 μ M mit Daunorubicin 300 nM sowie 500 nM, Ritonavir 5 μ M mit Daunorubicin 500 nM, Ritonavir 10 μ M mit Daunorubicin 500 nM und Ritonavir 20 μ M mit Daunorubicin 500 nM.

Tabelle 3.9: Einfluss von Ritonavir und Daunorubicin auf die Proliferation der THP-1-Zellen (48 h Inkubation)

		Ritonavir				
		0 nM	2 μ M	5 μ M	10 μ M	20 μ M
	0 nM	100,00%	78,68%	79,00%	69,57%	56,63%
Daunorubicin	5 nM	84,99%	86,77%	85,16%	80,51%	67,51%
	10 nM	90,92%	100,90%	99,86%	89,39%	71,92%
	50 nM	92,26%	102,13%	85,34%	78,57%	67,76%
	100 nM	88,72%	90,39%	94,20%	79,37%	76,74%
	300 nM	77,61%	75,23%	73,08%	71,44%	58,83%
	500 nM	87,56%	61,71%	57,14%	52,82%	39,57%

Effekt von Ritonavir und Daunorubicin auf die THP-1 Proliferation

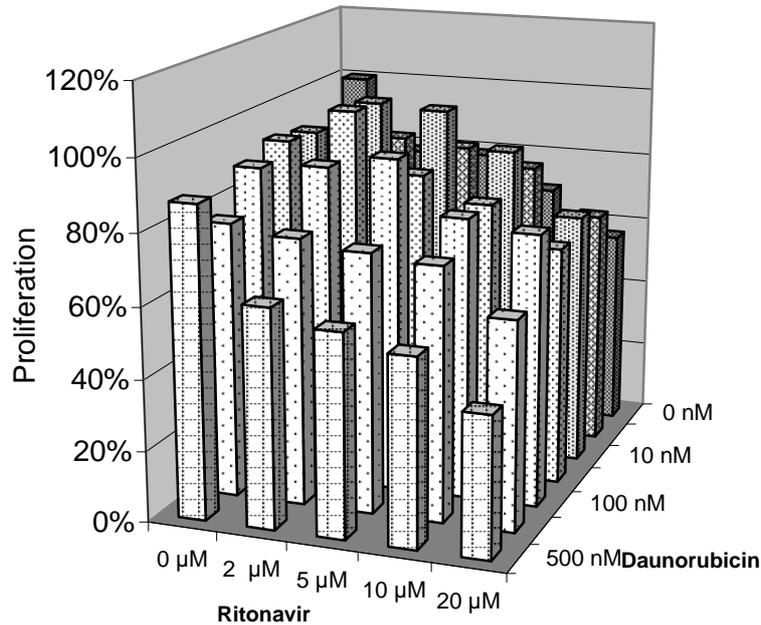


Abb. 3.26: Einfluss von Ritonavir und Daunorubicin auf die Proliferation der THP-1-Zellen. 48 h Inkubation

MTS-Assay (siehe Kapitel „Material und Methoden“).

Daunorubicin alleine senkte in der höchsten hier getesteten Konzentration von 500 nM die Proliferationsrate der THP-1-Zellen auf 87,56 %. 20 µM Ritonavir reduzierten das Zellwachstum auf 56,63%. In Kombination beider Inhibitoren verringerte sich die Proliferationsrate bei den gleichen Konzentrationen auf 39,57% - hierbei handelt es sich um einen Synergismus.

Eine Ritonavir-Konzentration von 20 µM senkte die Zellproliferation auf 56,63%. Kombiniert mit Daunorubicin 500 nM wurde diese synergistisch auf 39,57% gesenkt.

Auch bei den Kombinationen von Daunorubicin der Konzentrationen von 300 bzw. 500 nM mit Ritonavir 2 µM, Daunorubicin 500 nM mit Ritonavir 5 µM sowie Daunorubicin 500 nM mit Ritonavir 10 µM bzw. 20 µM impliziert die statistische Auswertung mittels normalisiertem Isobologramm ein Synergismus, jedoch bei insgesamt nicht konsistentem Ergebnis - siehe Abb. 3.27.

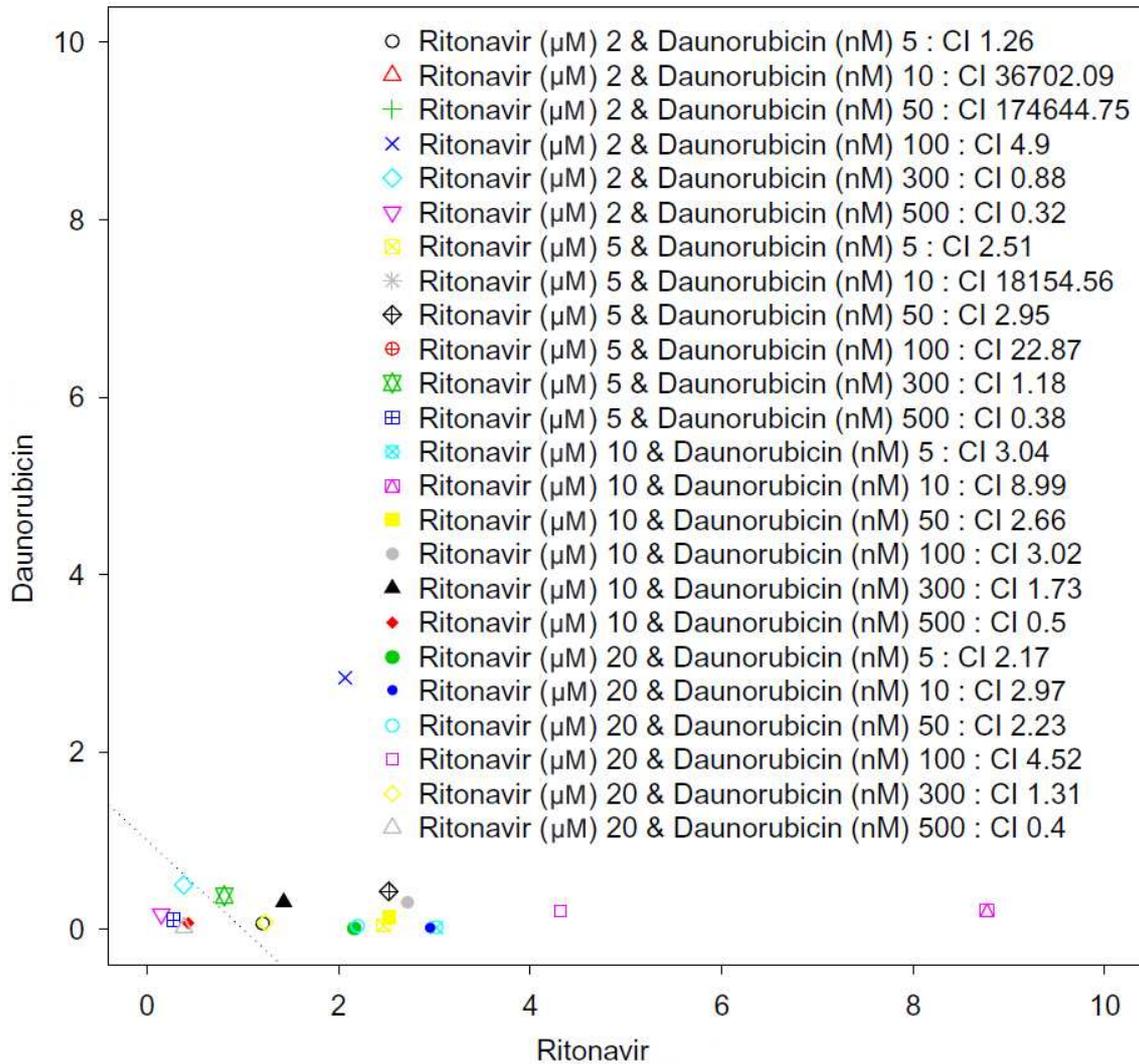


Abb. 3.27: Normalisiertes Isobologramm, Ritonavir und Daunorubicin, Zellen: THP-1.

Alle kombinierten Inhibitor-Konzentrationen mit einem *combination index* (CI) < 1 (Datenpunkte entsprechend links und unterhalb der punktierten Linie) wirken synergistisch hinsichtlich der Proliferationshemmung. Somit zeigt sich ein Synergismus bei folgenden Kombinationen: Ritonavir 2 µM mit Daunorubicin 300 nM bzw. 500 nM, Ritonavir 5 µM mit Daunorubicin 500 nM, Ritonavir 10 µM mit Daunorubicin 500 nM und Ritonavir 20 µM mit Daunorubicin 500 nM.

Ein CI über 1 (Datenpunkte rechts und oberhalb der punktierten Linie) spricht für einen Antagonismus.

Hier implizieren somit nur einzelne Datenpunkte einen Synergismus bei insgesamt allerdings nicht konsistentem Ergebnis, so dass ein Synergismus für Daunorubicin und HDACi I nicht konklusiv gezeigt werden kann.

3.3.3 Kombinationsversuche zur THP-1-Zellproliferation unter der Kombination von Bortezomib mit anderen Inhibitoren

(Kombination von Ritonavir und Bortezomib siehe 3.3.1)

3.3.3.1 Bortezomib und Valproat

Ein Synergismus zwischen Bortezomib und Valproat lässt sich in diesem Kombinationsversuch nicht erkennen.

Tabelle 3.10: Einfluss von Bortezomib und Valproat auf die Proliferation der THP-1-Zellen

		Bortezomib				
		0 nM	0,5 nM	1 nM	5 nM	10 nM
	0 mg/ml	100,00%	47,40%	54,85%	52,10%	67,35%
Valproat	2 mg/ml	108,22%	64,16%	76,32%	64,38%	63,15%
	5 mg/ml	100,00%	101,95%	84,86%	82,01%	66,58%
	10 mg/ml	87,57%	107,71%	97,08%	84,74%	75,12%
	20 mg/ml	89,77%	82,76%	60,32%	51,68%	40,89%

Effekt von Bortezomib und Valproat auf die THP-1
Proliferation, 48h Inkubation

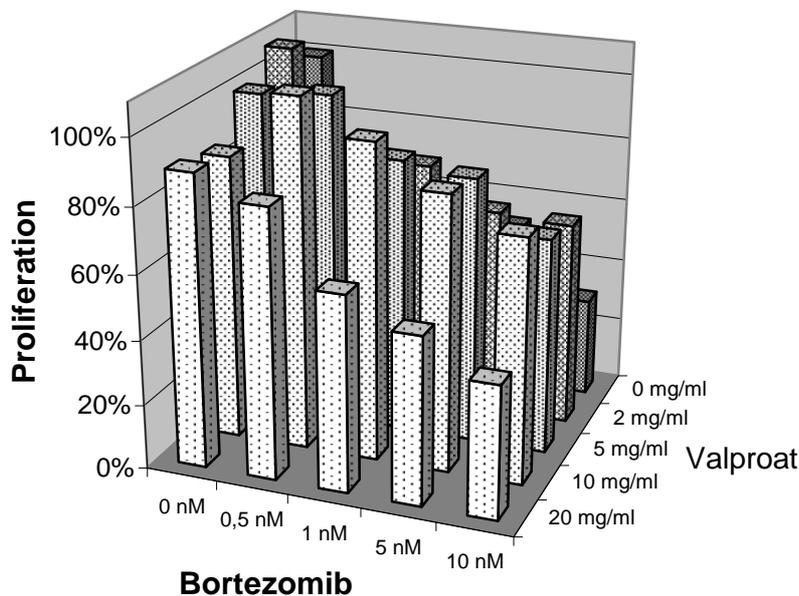


Abb. 3.28: Einfluss von Bortezomib und Valproat auf die Proliferation der THP-1-Zellen. 48 h Inkubation

In diesem Versuch (MTS-Assay, siehe Kapitel „Material und Methoden“) senkte Bortezomib in der höchsten getesteten Konzentration von 10 nM die Proliferationsrate auf 30,69%. 20 mg/ml Valproat reduzierten das Zellwachstum auf 89,77%. In Kombination beider Inhibitoren dieser Dosen verringerte sich die Proliferationsrate auf 40,89%.

3.3.3.2 Bortezomib und HDACi I

Auch in der Kombination von Bortezomib und dem Histondeacetylaseinhibitor HDACi I zeigt sich kein Synergismus bezüglich der Proliferationshemmung der THP-1-Zellen.

Tabelle 3.11: Einfluss von Bortezomib und HDACi I auf die Proliferation der THP-1-Zellen (48 h Inkubation)

		Bortezomib				
		0 nM	0,5 nM	1 nM	5 nM	10 nM
HDACi I	0 nM	100,00%	93,50%	96,01%	92,52%	84,41%
	30 nM	94,88%	96,78%	101,12%	96,85%	88,39%
	100 nM	97,05%	99,18%	104,07%	91,64%	87,13%
	300 nM	94,32%	98,51%	95,70%	94,65%	75,42%
	1 μ M	83,99%	87,61%	82,83%	88,35%	73,58%
	3 μ M	98,09%	103,99%	102,50%	99,65%	78,02%

Effekt von Bortezomib und HDACi I auf die THP-1 Proliferation, 48h Inkubation

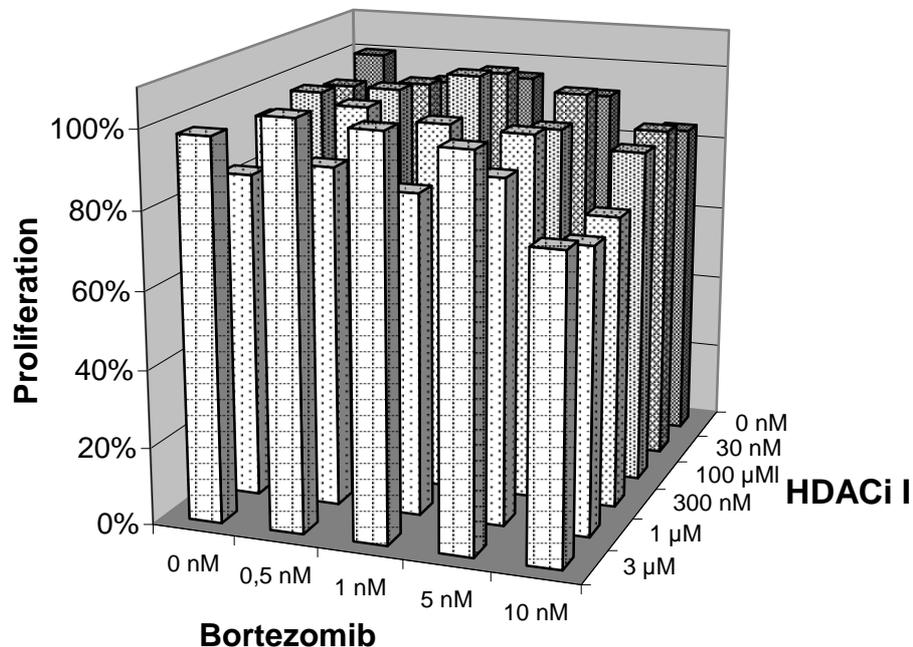


Abb. 3.29 Einfluss von Bortezomib und HDACi I auf die Proliferation der THP-1-Zellen. 48 h Inkubation

Bortezomib senkte hier in einer Konzentration von 10 nM die Proliferationsrate auf 84,41%.

3 μ M HDACi I reduzierten das Zellwachstum nur unwesentlich auf 98,09%.

In Kombination beider Inhibitoren verringerte sich die Proliferationsrate bei den gleichen Konzentrationen nur auf 78,02%.

3.3.3.3 Bortezomib und HDACi II

Die Kombination von Bortezomib und dem Histondeacetylaseinhibitor HDACi II lässt ebenfalls keinen Synergismus erkennen.

Tabelle 3.12: Einfluss von Bortezomib und HDACi II auf die Proliferation der THP-1-Zellen (48 h Inkubation)

		Bortezomib					
		0 nM	0,5 nM	1 nM	5 nM	10 nM	
	0 nM	100,00%	97,36%	93,65%	94,66%	89,04%	
HDACi II	30 nM	88,10%	88,99%	91,74%	100,59%	93,19%	
	100 nM	88,38%	97,70%	97,15%	98,34%	84,96%	
	300 nM	91,59%	95,37%	103,87%	108,41%	96,37%	
	1 µM	97,04%	102,65%	89,38%	86,56%	69,24%	
		3 µM	84,43%	93,87%	95,96%	92,18%	77,79%

Effekt von Bortezomib und HDACi II auf die THP-1 Proliferation, 48h Inkubation

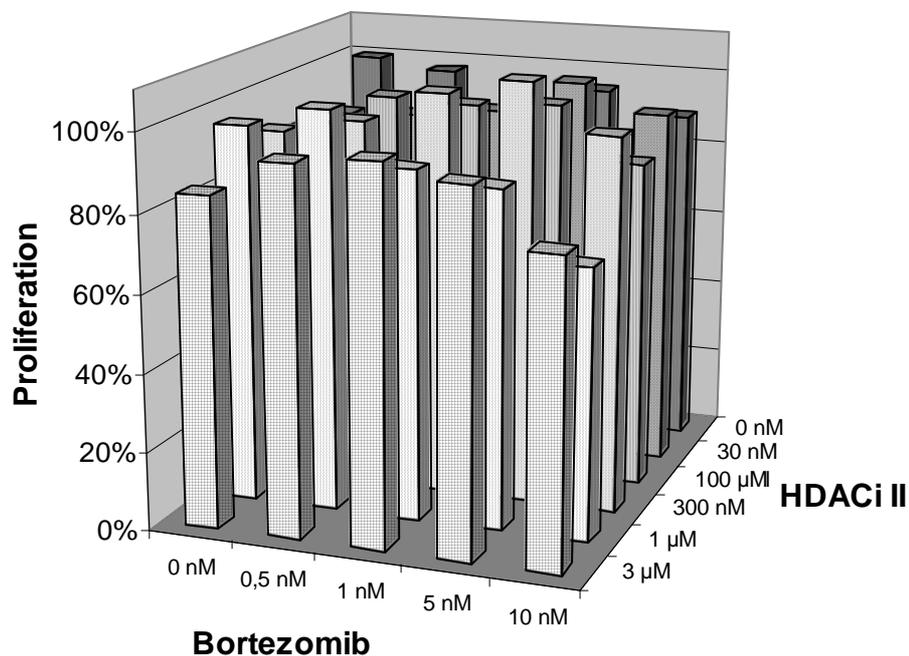


Abb. 3.30: Einfluss von Bortezomib und HDACi II auf die Proliferation der THP-1-Zellen. 48 h Inkubation

MTS-Assay (siehe Kapitel „Material und Methoden“).

Bortezomib senkte in einer Konzentration von 10 nM die Proliferationsrate auf 89,04%.

3 µM HDACi II reduzierten das Zellwachstum auf 84,43%.

In Kombination beider Inhibitoren verringerte sich die Proliferationsrate bei den gleichen Konzentrationen lediglich auf 77,79%.

3.3.3.4 Bortezomib und Daunorubicin

Die Kombination von Bortezomib und Daunorubicin ließ in folgenden Konzentrationen einen synergistischen Effekt hinsichtlich Wachstumshemmung der THP-1-Zellen erkennen:

Bortezomib 0,5 nM mit Daunorubicin 300 nM bzw. 500 nM, Bortezomib 1 nM mit Daunorubicin 5 nM, Bortezomib 1 nM mit Daunorubicin 300 nM bzw. 500 nM, Bortezomib 5 nM mit Daunorubicin 10 nM bzw. 50 nM, Bortezomib 5 nM mit Daunorubicin 300 nM bzw. 500 nM sowie Bortezomib 10 nM mit Daunorubicin in den getesteten Konzentrationen von 5 bis 500 nM.

Tabelle 3.13: Einfluss von Bortezomib und Daunorubicin auf die Proliferation der THP-1-Zellen, (48 h Inkubation)

		Bortezomib				
		0 nM	0,5 nM	1 nM	5 nM	10 nM
	0 nM	100,00%	105,94%	96,96%	100,11%	89,85%
Daunorubicin	5 nM	96,36%	103,94%	96,70%	104,63%	92,26%
	10 nM	102,65%	107,01%	103,06%	98,37%	89,45%
	50 nM	119,42%	117,75%	108,37%	97,24%	79,66%
	100 nM	106,30%	119,00%	109,04%	104,45%	83,62%
	300 nM	81,42%	85,14%	72,40%	70,24%	53,21%
	500 nM	43,22%	24,48%	22,41%	20,72%	12,51%

Effekt von Bortezomib und Daunorubicin auf die THP-1 Proliferation, 48h Inkubation

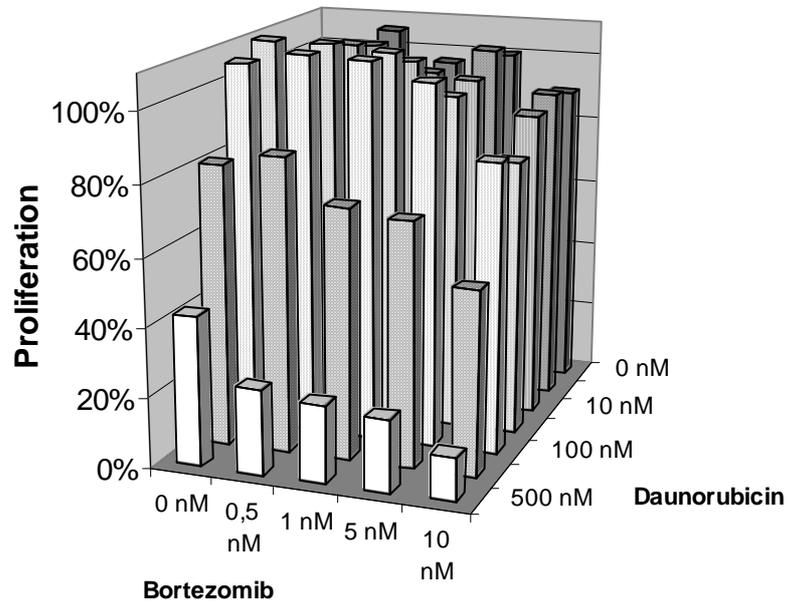


Abb. 3.31: Einfluss von Bortezomib und Daunorubicin auf die Proliferation der THP-1-Zellen. 48 h Inkubation

MTS-Assay (siehe Kapitel „Material und Methoden“).

Bortezomib senkte etwa in einer Konzentration von 10 nM die Proliferationsrate hier auf 89,85%. 500 nM Daunorubicin reduzierten das Zellwachstum auf 43,22%.

In Kombination beider Inhibitoren verringerte sich die Proliferationsrate bei den gleichen Konzentrationen auf 12,51%, was einem synergistischen Effekt entspricht (s. Abb. 3.32).

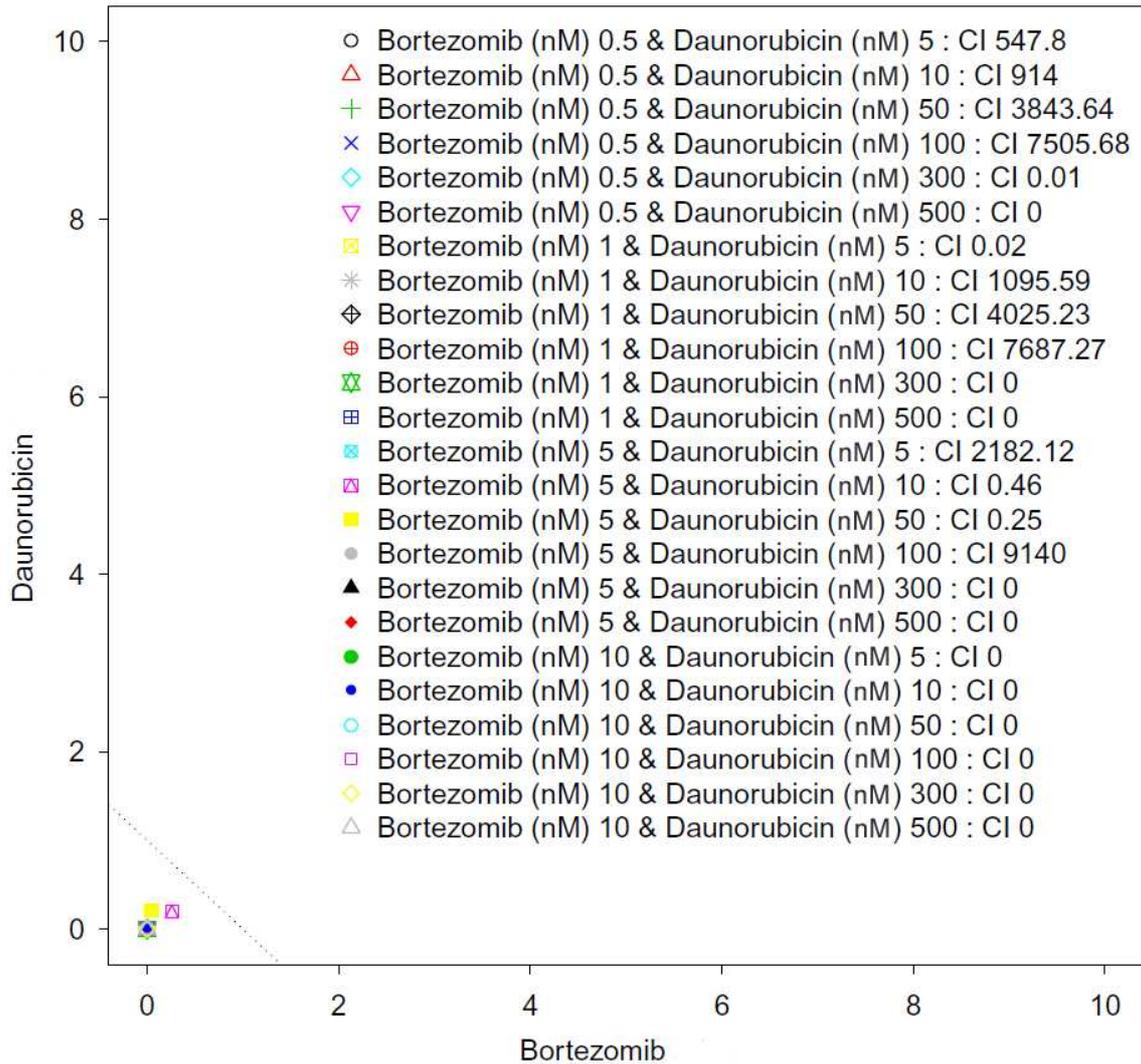


Abb. 3.32: Normalisiertes Isobologramm, Bortezomib und Daunorubicin, Zellen: THP-1.
 Alle kombinierten Inhibitor-Konzentrationen mit einem combination index (CI) < 1 (Datenpunkte entsprechend links und unterhalb der punktierten Linie) wirken synergistisch hinsichtlich der Proliferationshemmung. Somit zeigt sich ein Synergismus bei folgenden Kombinationen: Bortezomib 0,5 nM mit Daunorubicin 300 nM bzw. 500 nM, Bortezomib 1 nM mit Daunorubicin 5 nM, Bortezomib 1 nM mit Daunorubicin 300 nM bzw. 500 nM, Bortezomib 5 nM mit Daunorubicin 10 nM bzw. 50 nM, Bortezomib 5 nM mit Daunorubicin 300 nM bzw. 500 nM sowie Bortezomib 10 nM mit Daunorubicin in den getesteten Konzentrationen von 5 bis 500 nM. Ein CI über 1 (Datenpunkte rechts und oberhalb der punktierten Linie) spricht für einen Antagonismus.

4 DISKUSSION

Gegenstand dieser Dissertation ist die Einsatzmöglichkeit von Protease- bzw. Proteasominhibitoren in Kombination mit anderen innovativen antiproliferativen Wirkstoffen in der Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie.

Aufgrund hoher Rezidivraten, dem überwiegend hohen Alter der Betroffenen (medianes Erkrankungsalter von 63 Jahren) und damit einhergehender schlechterer Verträglichkeit aggressiver zytostatischer Therapieregimes besteht nach wie vor Bedarf an alternativen und ergänzenden Optionen zur Behandlung der AML. ^(50, 107, 115)

Mit Bortezomib (Velcade[®]) als erstem zugelassenen Vertreter der Proteasominhibitoren steht der Onkologie (wie auch anderen medizinischen Fachgebieten) eine weitere Therapieoption zur Verfügung, deren Kombination mit anderen, insbesondere bereits zugelassenen antiproliferativen Medikamenten, ein interessantes Forschungsgebiet darstellt. ⁽¹⁰⁴⁾

Hierzu bedarf es Methoden, die Zytotoxizität der jeweiligen Wirkstoffe nachzuweisen und ihren Effekt auf die Aktivität der katalytischen Proteasomuntereinheiten darzustellen:

4.1 Wahl der Methoden

Zum Nachweis der Zytotoxizität der verschiedenen Inhibitoren verwendete ich das kolorimetrische *CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* der Firma Promega, anhand dessen die Zellproliferation der einzelnen Proben auf Basis der photometrisch gemessenen Absorption bei 492 nm in Verhältnis zueinander gebracht und prozentual ausgedrückt werden kann - es besteht eine direkt proportionale Beziehung der Absorptionsrate mit der in den Wells befindlichen Zahl lebender Zellen. ^(95, 54)

Ich wählte dieses Verfahren, da es eine standardisierte und einfach zu handhabende Methode ist, die zahlreichen Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen bzw. Inkubationszeiten in Mikrotiterplatten in kurzer Zeit zu testen.

Ein allgemeiner Nachteil der Verwendung von Mikrotiterplatten ist in der Vielzahl von Wells mit kleinen Volumina zu sehen, da es bei der Bereitstellung der Proben, verglichen etwa mit Reagenzgläsern, leichter zu Fehlpipettierungen oder Verwechslungen kommen kann. Somit erfordert das Arbeiten hiermit trotz der einfachen Handhabung des Proliferationskits eine große Sorgfalt.

Mit dem *Active Site Labelling* mittels Anti-DansylAhx3L3VS (DALVS) Western Blot war es aufgrund der gegebenen Zellpermeabilität erstmals möglich, die Aktivität der katalytischen Proteasomuntereinheiten in intakten Zellen, in diesem Fall monozytären AML-Zellen der THP-1-Zelllinie bzw. primären AML-Blasten von Patienten, darzustellen. Hierdurch wird eine genaue Beurteilung der tatsächlichen Proteasomaktivität lebender Zellen ermöglicht, da deren Lysierung nicht mehr notwendig ist. ⁽¹¹⁾

Vergleichend setzte ich in meinen Laborarbeiten mit dem Anti-AdaK(bio)Ahx3L3VS Western Blot ein weiteres Verfahren zur Aktivitätsmarkierung des Proteasoms ein. Hierbei mussten die Zellen lysiert werden, um die katalytischen β -Untereinheiten des Proteasoms darstellen zu können.

Zur Validierung der von mir verwendeten Ergebnisse nutzte ich als Kontrolle etablierte Methoden:

Als Kontrolle der Proteasominhibition diente der etablierte Inhibitor NLVS. ⁽⁹⁰⁾

Bei der Darstellung der einzelnen Proteasomuntereinheiten wählte ich die murine Lymphom-Zellreihe EL-4 als Kontrolle, da diese in unserem Labor sowie von Kessler et al. hinsichtlich der Darstellung der β -Untereinheiten untersucht worden war und sowohl das konstitutive als auch das Immunoproteasom exprimiert. ^(60, 66)

Hinsichtlich der Versuche zur Auslösung von ER-Stress durch Ritonavir bzw. Bortezomib verwendete ich Tunicamycin als positive Kontrolle, da dies ein lange bekannter Induktor von ER-Stress ist.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Kombinationen mit Ritonavir

Neben dem eigentlichen Proteasominhibitor Bortezomib kam in meiner Arbeit dem schon lange zugelassenen HIV-Proteasehemmer Ritonavir eine zentrale Bedeutung zu, da auch ihm eine proteasominhibierende Wirkung zugeschrieben worden war und er antiproliferative Wirkungen zum Beispiel hinsichtlich HIV-assoziiertes Kaposi-Sarkome gezeigt hatte.⁽⁶⁾

Ritonavir war als einzeln getesteter Inhibitor und als Kombinationspartner unter anderem mit dem Proteasominhibitor Bortezomib besonders interessant.

Meine Ergebnisse zeigen erstmals die Zytotoxizität von Ritonavir nicht nur gegenüber einer humanen monoblastären Zelllinie, sondern auch gegenüber primären AML-Blasten in therapeutischen Dosen. Dabei zeigen sie, dass Ritonavir in niedrigen Konzentrationen (hier 2 und 5 μM) die Aktivität des Proteasoms in THP-1-Zellen steigert. Dies wurde zuvor von Gaedicke et al. (unter anderem bei EL-4-Zellen) beschrieben - auch hierdurch wird die von mir angewandte Methode zur Aktivitätsmarkierung des Proteasoms validiert.⁽³⁷⁾

Zum anderen zeigte sich aber, dass Ritonavir selbst in hohen aber noch pharmakologisch relevanten Dosen (bis 40 μM) keineswegs das Proteasom inhibiert. Es löst vielmehr ER-Stress aus, was sich im Western Blot als vermehrte Expression der UPR-assoziierten Proteine BiP, CHOP und PDI widerspiegelt.

Hinsichtlich der Wirkung von Bortezomib zeigen meine Ergebnisse, dass dieses ebenfalls zytotoxisch auf die THP-1-Zellen und die primären AML-Blasten wirkt, in Übereinstimmung mit früheren Daten anderer Untersucher bei AML-Zelllinien und Primärzellen.^(114, 119)

Bortezomib inhibiert selektiv die katalytischen $\beta 1(i)$ - und $\beta 5(i)$ -Untereinheiten des Proteasoms; in den hier verwendeten Dosen hingegen nicht die $\beta 2(i)$ -Untereinheiten. Dies wurde auch von Berkers et al. bei EL-4 Zellen beschrieben.⁽¹¹⁾

Darüber hinaus konnte ich bestätigen, dass Bortezomib ER-Stress auslöst; hier bei THP-1-Zellen und primären AML-Blasten von Patient 2.

Dies wurde von Nawrocki et al. (2005) sowie Lee et al. (2003) schon bei anderen Neoplasien dargestellt. ^(71, 91)

Als ein zentrales Ergebnis meiner Versuche stellte sich zudem heraus, dass Bortezomib und Ritonavir einen synergistischen Effekt auf die Proliferationshemmung von THP-1-Zellen haben. Unter Berücksichtigung der oben dargelegten Ergebnisse ist davon auszugehen, dass der in den Kombinationsversuchen deutlich gewordene Synergismus dieser beiden Wirkstoffe nicht auf einer direkten synergistischen Hemmung der $\beta 1$ -/ $\beta 5$ -Untereinheiten des Proteasoms beruht. Die synergistische Wirkung kommt zumindest unter anderem durch ein Zusammenspiel von ER-Stress (jeweils durch Bortezomib und Ritonavir) mit einer Proteasominhibition (durch Bortezomib) zustande.

Durch gesteigerten ER-Stress ist sogar eine Sensibilisierung primär Bortezomib-resistenter Tumorzellen (in dem Fall Sarkomzellen) mittels Ritonavir beschrieben.⁽⁶⁷⁾ Jene Arbeit beruht wesentlich auf den von mir hier beschriebenen synergistischen Effekten auf die Induktion von ER-Stress zwischen Bortezomib und Ritonavir.

Da Ritonavir als zugelassenes Medikament zur Verfügung steht, könnte der hier erstmals identifizierte Synergismus Bortezomib/Ritonavir in vivo im klinischen Experiment direkt untersucht werden. In der Tat findet eine weitere Entwicklung dieses Therapiekonzeptes im Rahmen der nationalen multizentrischen Studie SAKK 65/08 der Schweizer Arbeitsgruppe für Klinische Krebsforschung statt (*SAKK 65/08: Phase I Study of Bortezomib in Combination with Nelfinavir in Patients with Advanced Hematologic Malignancies*). Hier wird allerdings Nelfinavir anstelle von Ritonavir getestet, welches ein Nachfolgemedikament aus der gleichen Substanzgruppe mit noch besserer Verträglichkeit und Aktivität ist.

Während schon die Kombination aus Ritonavir 5 μ M und Bortezomib 5 nM eine synergistische antiproliferative Wirkung auf die THP-1-Zellen hatte, zeigte sich bei den verschiedenen primären AML-Blasten aus Patientenblut kein einheitlicher Effekt:

Bei den Blasten von Patient 1 zeigt sich ein Synergismus von Bortezomib und Ritonavir, da eine subtherapeutische Bortezomib-Dosis von 5 nM die Wirkung von Ritonavir in einer Konzentration von 20 μ M verstärkte. Die Beurteilbarkeit ist aufgrund der sehr starken Proliferationshemmung durch Ritonavir alleine (ab der niedrigsten getesteten Dosis von 20 μ M) aber eingeschränkt. Bortezomib alleine hemmte die Zellproliferation hier ab einer Konzentration von 10 nM.

In den Proliferationsversuchen mit den Blasten von Patient 2 ließ sich aus methodischen Gründen der Synergismus von Ritonavir und Bortezomib nicht feststellen:

Ritonavir alleine wirkte hier schon bei der niedrigsten getesteten Dosis von 10 μ M hemmend auf das Zellwachstum. Eine ausgeprägte Proliferationshemmung durch Bortezomib zeigte sich aber erst ab einer Konzentration von 20 nM.

Mittels Anti-DALVS Western Blot konnte auch bei diesen Zellen bestätigt werden, dass Ritonavir keinen inhibitorischen Effekt auf die aktiven Proteasomuntereinheiten hat. Hier wäre eine erneute Testung mit niedrigeren Ritonavir-Konzentrationen erforderlich gewesen, wozu jedoch keine Zellen dieses Patienten mehr zur Verfügung standen.

Auch bei den primären AML-Blasten von Patient 3 ließ sich kein Synergismus von Ritonavir und Bortezomib nachweisen. Die Wirkung von Ritonavir alleine setzte ebenfalls bei der (kleinsten getesteten) Konzentration von 10 μ M ein, Bortezomib hemmte das Zellwachstum aber schon ab einer Konzentration von 5 nM leicht.

Diese uneinheitlichen Wirkungsprofile könnten unter anderem auf der unterschiedlichen Sensibilität der AML-Blasten auf Bortezomib beruhen.

Diese wurde von Matondo et al. (2009) mit der Menge des vorhandenen 20S-Proteasoms in Verbindung gebracht. ⁽⁸²⁾

Zudem besteht, wie bei Kraus et al. (2007) beschrieben, in primären Leukämiezellen eine ausgeprägte Variabilität hinsichtlich der Menge an aktiven β 1/1i, β 2/2i und β 5/5i-Untereinheiten des Proteasoms - bei konstanter Proteinexpression. Auch dieses Muster der Proteasomaktivität beeinflusst die Sensibilität gegenüber Bortezomib: Eine hohe Aktivität der β 2/2i-Untereinheiten

oder niedrige Aktivität der $\beta 1/1i$ - bzw. $\beta 5/5i$ -Untereinheiten bewirkt eine höhere Empfindlichkeit der Leukämiezellen gegenüber Bortezomib. ⁽⁶⁶⁾

Eine Bortezomib-Resistenz von Leukämiezellen kann auch auf Mutation der proteasomalen $\beta 5$ -Untereinheit beruhen, wie es bei der Linie THP-1/BTZ500 der Fall ist. In Versuchen von Li et al. (2010), ebenfalls unter Verwendung des *CellTiter 96*® *AQueous One Solution Cell Proliferation Assays*, konnte eine solche Resistenz mithilfe des nichtkompetitiven Proteasominhibitors 5AHQ überwunden werden. Dieser bindet nichtkatalytisch an den α -Untereinheiten des 20S-Proteasoms, was eine alternative oder komplementäre Therapieoption darstellt. ⁽⁷⁴⁾

Die drei Histondeacetylaseinhibitoren Valproinsäure, HDACi I und HDACi II wählte ich in meinen Versuchen, da das Profil der Histondeacetylase-Genexpression (unter anderem) in AML-Zellen verändert ist und eine Hyperacetylierung durch Inhibition der Histondeacetylase zu Differenzierung bzw. Apoptose transformierter Zellen führen kann (siehe auch Einleitung). ^(13, 68, 81)

Während ich in meinen Versuchen keine signifikante antiproliferative Wirkung von Valproat bzw. HDACi II alleine oder in Kombination mit Ritonavir auf die THP-1-Zellen reproduzieren konnte, implizieren einige Datenpunkte in der Kombination von Ritonavir mit HDACi I einen synergistischen Effekt; bei insgesamt aber inkonsistentem Ergebnis kann allerdings kein Synergismus konklusiv gezeigt werden. Dies gilt ebenso für die Kombination von Ritonavir mit dem etablierten Zytostatikum Daunorubicin - alleine gegeben hatte dieses in der verwendeten Konzentration nur eine geringe Proliferationshemmung zur Folge, in Kombination mit Ritonavir sprachen lediglich einige Datenpunkten für einen Synergismus.

4.2.2 Kombinationen mit Bortezomib

Valproat, HDACi I und HDACi II führten als Kombinationspartner von Bortezomib zu keiner additiven oder gar synergistischen Proliferationshemmung der THP-1-Zellen. Lediglich in der Kombination Bortezomib und Daunorubicin zeigte sich hier eine synergistische Wirkung. Dabei liegt die verwendete

Konzentration des Daunorubicin mit 500 nM in etwa bei der Hälfte der erreichten Plasmakonzentration bei einer Standard-AML-Therapie mit Daunorubicin 50 mg/m².

4.3 Schlussfolgerung

Bortezomib und Ritonavir hemmen synergistisch und mit unterschiedlichem molekularem *Target* das Wachstum der AML-Zelllinie THP-1.

Die Proliferation verschiedener primärer AML-Blasten wird allerdings in unterschiedlicher Ausprägung und nicht bei allen Patienten (hier bei den Zellen von Patient 1) synergistisch inhibiert.

Während Bortezomib selektiv die katalytischen $\beta 1(i)$ - und $\beta 5(i)$ -Untereinheiten des Proteasoms inhibiert sowie ER-Stress auslöst, beruht die zytotoxische Wirkung von Ritonavir (zumindest unter anderem) auf der Induktion von ER-Stress, ohne dass es zusätzlich, wie zuvor postuliert, das Proteasom hemmt. ⁽⁶⁾ Physiologisch erreichbare Ritonavir-Konzentrationen hemmen das Proteasom nicht.

Die Kombination von Bortezomib mit Daunorubicin hat ebenso einen synergistischen Effekt.

Diese Ergebnisse könnten sich zur Entwicklung neuer Therapiestrategien bei der AML nutzen lassen. Das vorrangige Ziel meiner Dissertation ist schließlich, auf dem Boden dieser Erkenntnisse weiterführenden in-vitro-Studien und letztlich klinischen Phase-1-Studien mit bereits zugelassenen Medikamenten wie Bortezomib und beispielsweise einem HIV-Proteaseinhibitor bzw. dem Anthrazyklin Daunorubicin den Weg zu ebnen, da bei diesen zeitnahe Resultate und eine entsprechend rasche therapeutische Umsetzung zu erwarten sind.

Hinsichtlich der Wahl des HIV-Proteasehemmers sind dem mit starken gastrointestinalen Beschwerden und dem hohen Risiko einer Lipodystrophie nebenwirkungsreichen Ritonavir andere, besser verträgliche HIV-Proteaseinhibitoren wie Nelfinavir oder Atazanavir ⁽⁴⁰⁾ möglicherweise vorzuziehen.

Die vergleichbaren Resultate der beiden angewandten Labelling-Methoden (Anti-AdaK(bio)Ahx₃L₃VS Western Blot mit lysierten Zellen und Anti-

DansylAhx₃L₃VS (DALVS) Western Blot mit vitalen Zellen) hinsichtlich Aktivität der katalytischen Proteasomuntereinheiten deuten darauf hin, dass die Ergebnisse der neuen DALVS-Methode des intrazellulären Labellings in meinen Experimenten valide sind. Außerdem impliziert die Vergleichbarkeit, dass die Post-Lysis-Artefakte bei der Proteasomaktivitätsmessung geringer sind als bisher angenommen.

Aufgrund der einfacheren Verwendung bietet sich das intrazelluläre DALVS-Labelling für die Zukunft an.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) als Hauptabbauweg intrazellulärer Proteine ist maßgeblich an der Homöostase des eukaryotischen Organismus aber auch an der Pathogenese verschiedenster Krankheiten beteiligt.

Als Teil des ERAD-Systems (*ER-Associated Degradation*) mit seinen komplexen Signalwegen kommt dem Proteasom eine zentrale Bedeutung in Zellüberleben oder Zelltod in Form von Apoptose zu.

Durch eine medikamentöse Inhibition des Proteasoms mittels Bortezomib, dem ersten zugelassenen Vertreter aus der Gruppe der Proteasominhibitoren, kann die Apoptose maligner Zellen ausgelöst werden. Dies geschieht unter anderem über eine Hemmung des Zellzyklus, eine Inhibition von *Pro-Survival*-Signalen wie NF- κ B und in besonderem Maße durch die Induktion von ER-Stress.

Trotz des hohen therapeutischen Potentials von Proteasominhibitoren ist relativ wenig über die Aktivität und Funktion des Proteasoms in menschlichen malignen Zellen bekannt. Ein Grund dafür ist, dass sich die Aktivität dieses Enzymkomplexes mit herkömmlichen zellbiologischen Techniken wie Western Blot oder PCR nicht direkt ermitteln lässt, da diese Untersuchungen nichts über die Aktivität der katalytischen Proteasomuntereinheiten aussagen können.

Mit Hilfe der von einem kovalent bindenden Proteasominhibitor abgeleiteten Affinitätssonde DansylAhx₃L₃VS (DALVS) werden in dieser Arbeit erstmals selektiv die aktiven Proteasomuntereinheiten in vitalen malignen humanen hämatopoetischen Zellen dargestellt. Wie erwartet konnte die selektive Wirkung von Bortezomib auf die β 1/ β 5 katalytischen Untereinheiten des Proteasoms bestätigt werden.

Da postuliert wird, dass auch der HIV-Proteaseinhibitor Ritonavir eine proteasominhibierende Aktivität hat (und dieses Medikament damit potentiell sehr interessant für die Therapie hämatologischer Neoplasien sein könnte), untersuchte ich den Effekt von Ritonavir auf eine AML-Zelllinie sowie primäre AML-Blasten mittels der Methode der Affinitätsmarkierung. Ich konnte dabei deutlich zeigen, dass Ritonavir in den klinisch relevanten Konzentrationen das Proteasom nicht inhibiert. Erstaunlicherweise führte Ritonavir jedoch, ganz

ähnlich wie Bortezomib, zu einer der Proteasominhibition nachgeschalteten Aktivierung der *Unfolded Protein Response* (UPR), welche für die Induktion von Apoptose verantwortlich ist. Obwohl also Ritonavir das Proteasom nicht inhibiert, bewirkt es eine ähnlich effektive Aktivierung der UPR wie Bortezomib und hemmt in klinisch relevanten Konzentrationen die Proliferation von AML-Zelllinien und primären humanen Blasten.

In Synergismus-Tests konnte ich daraufhin zeigen, dass die Kombination von Ritonavir und Bortezomib synergistisch das Wachstum der AML-Zelllinie THP-1 hemmt. Dieser Synergismus ließ sich bei einer von drei getesteten Proben von primären humanen AML-Blasten bestätigen.

Andere in der derzeitigen Entwicklung befindliche potentielle Therapeutika für die AML, wie die Histondeacetylasehemmer Valproat, HDACi I und HDACi II sowie das Anthrazyklin-Zytostatikum Daunorubicin, zeigten keine bzw. im Fall von HDACi I respektive Daunorubicin keine eindeutige synergistische Zytotoxizität in Kombination mit Ritonavir.

Die Kombination von Bortezomib mit Daunorubicin zeigte dagegen eine synergistische Wirkung.

Insgesamt konnte ich durch meine experimentelle Arbeit zeigen, dass Bortezomib und Ritonavir über unterschiedliche Mechanismen (Bortezomib durch Proteasominhibition, Ritonavir unabhängig von Proteasominhibition) synergistisch ER-Stress induzieren und das Wachstum der AML-Zelllinie THP-1 hemmen.

Diese Ergebnisse stehen nun für die weitere Entwicklung neuer onkologischer Therapiekonzepte zur Verfügung. Die Tatsache, dass es sich bei den drei synergistisch und mit unterschiedlichen Mechanismen wirkenden Stoffen (Bortezomib, Daunorubicin, Ritonavir) um bereits zugelassene Medikamente handelt, prädestiniert sie für zeitnahe klinische Studien außerhalb der kommerziellen Medikamentenentwicklung.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 1999 Jun 1; **59**(11): 2615-2622.
2. Advani R, Saba HI, Tallman MS, Rowe JM, Wiernik PH, Ramek J, Dugan K, Lum B, Villena J, Davis E, Paietta E, Litchman M, Sikic BI, Greenberg PL. Treatment of refractory and relapsed acute myelogenous leukemia with combination chemotherapy plus the multidrug resistance modulator PSC 833 (Valspodar). *Blood* 1999 Feb 1; **93**(3): 787-795.
3. Aki M, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, Tamura T, Tanahashi N, Yoshimura T, Tanaka K, Ichihara A. Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem* 1994 Feb; **115**(2): 257-269.
4. Allfrey VG. Post synthetic modifications of histone: a mechanism for the control of chromosome structure by the modulation of histones—DNA interactions. In: Li HJ ER (ed). *Chromatin and chromosome structure*. Academic Press: New York, 1977, pp p. 167–191.
5. Almond JB, Cohen GM. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2002 Apr; **16**(4): 433-443.
6. Andre P, Groettrup M, Klenerman P, de Giuli R, Booth BL, Jr., Cerundolo V, Bonneville M, Jotereau F, Zinkernagel RM, Lotteau V. An inhibitor of HIV-1 protease modulates proteasome activity, antigen presentation, and T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Oct 27; **95**(22): 13120-13124.
7. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998 Aug 28; **281**(5381): 1305-1308.
8. Baer MR, George SL, Dodge RK, O'Loughlin KL, Minderman H, Caligiuri MA, Anastasi J, Powell BL, Kolitz JE, Schiffer CA, Bloomfield CD, Larson RA. Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *Blood* 2002 Aug 15; **100**(4): 1224-1232.
9. Bauer JH, Helfand SL. New tricks of an old molecule: lifespan regulation by p53. *Aging Cell* 2006 Oct; **5**(5): 437-440.

10. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996 Nov 1; **274**(5288): 782-784.
11. Berkers CR, Verdoes M, Lichtman E, Fiebiger E, Kessler BM, Anderson KC, Ploegh HL, Ovaa H, Galardy PJ. Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib. *Nat Methods* 2005 May; **2**(5): 357-362.
12. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003 Dec; **15**(6): 725-731.
13. Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, Bunce CM, White DA, Drayson MT, Craddock C, Turner BM. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia* 2005 Oct; **19**(10): 1751-1759.
14. Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 2003 Nov 24; **22**(53): 8608-8618.
15. Cayman. Cayman product information MS-275 (HDACi I). [cited 03/2010]; Available from: <http://www.caymanchem.com/pdfs/13284.pdf>
16. Chene P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003 Feb; **3**(2): 102-109.
17. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 2004 Feb 13; **303**(5660): 1010-1014.
18. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 2006 Sep; **58**(3): 621-681.
19. Coffey DC, Kutko MC, Glick RD, Butler LM, Heller G, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM, La Quaglia MP. The histone deacetylase inhibitor, CBHA, inhibits growth of human neuroblastoma xenografts in vivo, alone and synergistically with all-trans retinoic acid. *Cancer Res* 2001 May 1; **61**(9): 3591-3594.
20. Collatz K-G. ESSAY „Apoptose“. Lexikon der Biologie: Spektrum Akademischer Verlag.
21. Conant MA, Opp KM, Poretz D, Mills RG. Reduction of Kaposi's sarcoma lesions following treatment of AIDS with ritonavir. *AIDS* 1997 Aug; **11**(10): 1300-1301.

22. Coyle TE, Bair AK, Stein C, Vajpayee N, Mehdi S, Wright J. Acute leukemia associated with valproic acid treatment: a novel mechanism for leukemogenesis? *Am J Hematol* 2005 Apr; **78**(4): 256-260.
23. De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, Remington SJ, Youle RJ, Ichas F. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *Faseb J* 2002 Apr; **16**(6): 607-609.
24. Distelhorst CW. Recent insight into the structure and function of the glucocorticoid receptor. *J Lab Clin Med* 1989 Apr; **113**(4): 404-412.
25. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 2007 Oct; **5**(10): 981-989.
26. Drexler HC. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Feb 4; **94**(3): 855-860.
27. Fachinfo. Fachinfo Ritonavir. [cited 02/2010]; Available from: www.fachinfo.de
28. Fachinfo. Fachinfo Velcade [cited 02/2010]; Available from: www.fachinfo.de
29. Fachinfo. Fachinfo Daunoblastin. [cited 03/2010]; Available from: <http://www.fachinfo.de>
30. Fachinfo. Fachinformation Orfiril (Natriumvalproat). [cited 03/2010]; Available from: <http://www.fachinfo.de/viewFI?FINR=004509&RL=Orfiril%26reg%3B%20100%26nbsp%3Bmg/ml%20Injektionsl%26ouml%3Bsung>
31. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005 Dec; **258**(6): 479-517.
32. Faderl S, Verstovsek S, Cortes J, Ravandi F, Beran M, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Estrov Z, O'Brien S, Koller C, Giles FJ, Wierda W, Kwari M, Kantarjian HM. Clofarabine and cytarabine combination as induction therapy for acute myeloid leukemia (AML) in patients 50 years of age or older. *Blood* 2006 Jul 1; **108**(1): 45-51.
33. Faitova J, Krekac D, Hrstka R, Vojtesek B. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Cell Mol Biol Lett* 2006; **11**(4): 488-505.

34. Fehniger TA, Uy GL, Trinkaus K, Nelson AD, Demland J, Abboud CN, Cashen AF, Stockerl-Goldstein KE, Westervelt P, Dipersio JF, Vij R. A phase II study of high dose lenalidomide as initial therapy for older patients with acute myeloid leukemia. *Blood* Nov 4.
35. Fisher RI, Bernstein SH, Kahl BS, Djulbegovic B, Robertson MJ, de Vos S, Epner E, Krishnan A, Leonard JP, Lonial S, Stadtmauer EA, O'Connor OA, Shi H, Boral AL, Goy A. Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006 Oct 20; **24**(30): 4867-4874.
36. Furman MH, Ploegh HL. Lessons from viral manipulation of protein disposal pathways. *J Clin Invest* 2002 Oct; **110**(7): 875-879.
37. Gaedicke S, Firat-Geier E, Constantiniu O, Lucchiari-Hartz M, Freudenberg M, Galanos C, Niedermann G. Antitumor effect of the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir: induction of tumor-cell apoptosis associated with perturbation of proteasomal proteolysis. *Cancer Res* 2002 Dec 1; **62**(23): 6901-6908.
38. Garcia-Manero G, Yang H, Bueso-Ramos C, Ferrajoli A, Cortes J, Wierda WG, Faderl S, Koller C, Morris G, Rosner G, Loboda A, Fantin VR, Randolph SS, Hardwick JS, Reilly JF, Chen C, Ricker JL, Secrist JP, Richon VM, Frankel SR, Kantarjian HM. Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2008 Feb 1; **111**(3): 1060-1066.
39. Gerrard G, Payne E, Baker RJ, Jones DT, Potter M, Prentice HG, Ethell M, McCullough H, Burgess M, Mehta AB, Ganeshaguru K. Clinical effects and P-glycoprotein inhibition in patients with acute myeloid leukemia treated with zosuquidar trihydrochloride, daunorubicin and cytarabine. *Haematologica* 2004 Jul; **89**(7): 782-790.
40. Gills JJ, Lopiccolo J, Tsurutani J, Shoemaker RH, Best CJ, Abu-Asab MS, Borojerdi J, Warfel NA, Gardner ER, Danish M, Hollander MC, Kawabata S, Tsokos M, Figg WD, Steeg PS, Dennis PA. Nelfinavir, A lead HIV protease inhibitor, is a broad-spectrum, anticancer agent that induces endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2007 Sep 1; **13**(17): 5183-5194.
41. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002 Apr; **82**(2): 373-428.
42. Gökbüget N, Ganser, A., Schlenk. R.F. Leitlinie Akute Leukämien. DGHO; 2005.

43. Gomez-Abuin G, Winqvist E, Stadler WM, Pond G, Degendorfer P, Wright J, Moore MJ. A phase II study of PS-341 (Bortezomib) in advanced or metastatic urothelial cancer. A trial of the Princess Margaret Hospital and University of Chicago phase II consortia. *Invest New Drugs* 2007 Apr; **25**(2): 181-185.
44. Green SR, Choudhary AK, Fleming IN. Combination of sapacitabine and HDAC inhibitors stimulates cell death in AML and other tumour types. *Br J Cancer* 2010 Oct 26; **103**(9): 1391-1399.
45. Groettrup M, Kraft R, Kostka S, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM. A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur J Immunol* 1996 Apr; **26**(4): 863-869.
46. Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH, Finley D. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 2000 Nov; **7**(11): 1062-1067.
47. Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 1997 Aug 22; **90**(4): 595-606.
48. Harrison TR (ed). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Mc Graw-Hill, New York, 2004.
49. Hasselgren PO. Ubiquitination, phosphorylation, and acetylation--triple threat in muscle wasting. *J Cell Physiol* 2007 Dec; **213**(3): 679-689.
50. Herold G (ed). *Innere Medizin 2004*. Eigenverlag, 2003.
51. Hershko A, Ciechanover A, Rose IA. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979 Jul; **76**(7): 3107-3110.
52. Hideshima T, Chauhan D, Hayashi T, Akiyama M, Mitsiades N, Mitsiades C, Podar K, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC. Proteasome inhibitor PS-341 abrogates IL-6 triggered signaling cascades via caspase-dependent downregulation of gp130 in multiple myeloma. *Oncogene* 2003 Nov 20; **22**(52): 8386-8393.
53. Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P, Schlossman R, Podar K, Munshi NC, Mitsiades N, Anderson KC. Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood* 2003 Feb 15; **101**(4): 1530-1534.
54. Jain-Vora S, Wert SE, Temann UA, Rankin JA, Whitsett JA. Interleukin-4 alters epithelial cell differentiation and surfactant homeostasis in the

- postnatal mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997 Nov; **17**(5): 541-551.
55. Kanz L. Neoplasien. In: Siegenthaler W (ed). *Klinische Pathophysiologie*, 8th edn. Thieme Verlag, Stuttgart New York 2000.
 56. Karp JE, Gojo I, Pili R, Gocke CD, Greer J, Guo C, Qian D, Morris L, Tidwell M, Chen H, Zwiebel J. Targeting vascular endothelial growth factor for relapsed and refractory adult acute myelogenous leukemias: therapy with sequential 1-beta-d-arabinofuranosylcytosine, mitoxantrone, and bevacizumab. *Clin Cancer Res* 2004 Jun 1; **10**(11): 3577-3585.
 57. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 1999 May 15; **13**(10): 1211-1233.
 58. Kawagoe R, Kawagoe H, Sano K. Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and -independent apoptotic signaling pathways. *Leuk Res* 2002 May; **26**(5): 495-502.
 59. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 Aug; **26**(4): 239-257.
 60. Kessler BM, Tortorella D, Altun M, Kisselev AF, Fiebigler E, Hekking BG, Ploegh HL, Overkleeft HS. Extended peptide-based inhibitors efficiently target the proteasome and reveal overlapping specificities of the catalytic beta-subunits. *Chem Biol* 2001 Sep; **8**(9): 913-929.
 61. Kisselev AF, Garcia-Calvo M, Overkleeft HS, Peterson E, Pennington MW, Ploegh HL, Thornberry NA, Goldberg AL. The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J Biol Chem* 2003 Sep 19; **278**(38): 35869-35877.
 62. Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Mar; **2**(3): 179-187.
 63. Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Shikami M, Cabreira-Hansen M, McQueen T, Ruvolo V, Tsao T, Zeng Z, Vassilev LT, Andreeff M. MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood* 2005 Nov 1; **106**(9): 3150-3159.
 64. Kondagunta GV, Drucker B, Schwartz L, Bacik J, Marion S, Russo P, Mazumdar M, Motzer RJ. Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2004 Sep 15; **22**(18): 3720-3725.

65. Kramer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzl T, Gottlicher M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J* 2003 Jul 1; **22**(13): 3411-3420.
66. Kraus M, Ruckrich T, Reich M, Gogel J, Beck A, Kammer W, Berkers CR, Burg D, Overkleeft H, Ovaa H, Driessen C. Activity patterns of proteasome subunits reflect bortezomib sensitivity of hematologic malignancies and are variable in primary human leukemia cells. *Leukemia* 2007 Jan; **21**(1): 84-92.
67. Kraus M, Malenke E, Gogel J, Muller H, Ruckrich T, Overkleeft H, Ovaa H, Koscielniak E, Hartmann JT, Driessen C. Ritonavir induces endoplasmic reticulum stress and sensitizes sarcoma cells toward bortezomib-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2008 Jul; **7**(7): 1940-1948.
68. Kuendgen A, Schmid M, Schlenk R, Knipp S, Hildebrandt B, Steidl C, Germing U, Haas R, Dohner H, Gattermann N. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 2006 Jan 1; **106**(1): 112-119.
69. Lara PN, Jr., Chansky K, Davies AM, Franklin WA, Gumerlock PH, Guaglianone PP, Atkins JN, Farneth N, Mack PC, Crowley JJ, Gandara DR. Bortezomib (PS-341) in relapsed or refractory extensive stage small cell lung cancer: a Southwest Oncology Group phase II trial (S0327). *J Thorac Oncol* 2006 Nov; **1**(9): 996-1001.
70. Larson RA, Sievers EL, Stadtmauer EA, Lowenberg B, Estey EH, Dombret H, Theobald M, Voliotis D, Bennett JM, Richie M, Leopold LH, Berger MS, Sherman ML, Loken MR, van Dongen JJ, Bernstein ID, Appelbaum FR. Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first recurrence. *Cancer* 2005 Oct 1; **104**(7): 1442-1452.
71. Lee AH, Iwakoshi NN, Anderson KC, Glimcher LH. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Aug 19; **100**(17): 9946-9951.
72. Lehle L, Tanner W. The specific site of tunicamycin inhibition in the formation of dolichol-bound N-acetylglucosamine derivatives. *FEBS Lett* 1976 Nov 15; **72**(1): 167-170.
73. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, Head DR, Appelbaum FR, Willman CL. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to

- standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood* 1997 May 1; **89**(9): 3323-3329.
74. Li X, Wood TE, Sprangers R, Jansen G, Franke NE, Mao X, Wang X, Zhang Y, Verbrugge SE, Adomat H, Li ZH, Trudel S, Chen C, Religa TL, Jamal N, Messner H, Cloos J, Rose DR, Navon A, Guns E, Batey RA, Kay LE, Schimmer AD. Effect of noncompetitive proteasome inhibition on bortezomib resistance. *J Natl Cancer Inst* Jul 21; **102**(14): 1069-1082.
75. Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH, Jr., Evans RM. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 1998 Feb 19; **391**(6669): 811-814.
76. List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, Dorr R, Karanes C, Hynes HE, Doroshow JH, Shurafa M, Appelbaum FR. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2001 Dec 1; **98**(12): 3212-3220.
77. Ma Y, Hendershot LM. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer* 2004 Dec; **4**(12): 966-977.
78. Mackay H, Hedley D, Major P, Townsley C, Mackenzie M, Vincent M, Degendorfer P, Tsao MS, Nicklee T, Birle D, Wright J, Siu L, Moore M, Oza A. A phase II trial with pharmacodynamic endpoints of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005 Aug 1; **11**(15): 5526-5533.
79. Manfred Dietel NS, Martin Zeitz (ed). *Harrisons Innere Medizin 17. Auflage*. ABW Wissenschaftsverlag, 2008.
80. Marcucci G, Stock W, Dai G, Klisovic MI, Maharry K, Shen T, Liu S, Sher DA, Lucas D, Zwiebel A, Larson RA, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Chan KK, Grever MR, Byrd JC. G3139, a BCL-2 antisense oligo-nucleotide, in AML. *Ann Hematol* 2004; **83 Suppl 1**: S93-94.
81. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* 2000 Aug 2; **92**(15): 1210-1216.
82. Matondo M, Bousquet-Dubouch MP, Gallay N, Uttenweiler-Joseph S, Recher C, Payrastre B, Manenti S, Monsarrat B, Burlet-Schiltz O. Proteasome inhibitor-induced apoptosis in acute myeloid leukemia: A correlation with the proteasome status. *Leuk Res* 2009 Oct 5.

83. McCracken AA, Brodsky JL. Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol* 1996 Feb; **132**(3): 291-298.
84. Merck. Calbiochem Histone Deacetylase Inhibitor I information [cited 02/2010]; Available from: http://www.merck-chemicals.de/life-science-research/histone-deacetylase-inhibitor-i/EMD_BIO-382147/p_Cxub.s1LJCIAAAEWwmEfVhTm?WFSimpleSearch_NameOrlD=Histon+inhibitor&BackButtonText=search+results
85. Merck. Calbiochem Histone Deacetylase Inhibitor II information [cited 02/2010]; Available from: http://www.merck-chemicals.de/life-science-research/histone-deacetylase-inhibitor-ii/EMD_BIO-382148/p_Cxub.s1LJCIAAAEWwmEfVhTm?WFSimpleSearch_NameOrlD=Histon+inhibitor&BackButtonText=search+results
86. Merck. Inhibitor SourceBook. [cited 02/2010]; 2nd:[Available from: <http://teachline.ls.huji.ac.il/72682/Booklets/CALBIOCHEM-Inhibitors.pdf>
87. Mesters RM, Padro T, Bieker R, Steins M, Kreuter M, Goner M, Kelsey S, Scigalla P, Fiedler W, Buchner T, Berdel WE. Stable remission after administration of the receptor tyrosine kinase inhibitor SU5416 in a patient with refractory acute myeloid leukemia. *Blood* 2001 Jul 1; **98**(1): 241-243.
88. Muller CI, Ruter B, Koeffler HP, Lubbert M. DNA hypermethylation of myeloid cells, a novel therapeutic target in MDS and AML. *Curr Pharm Biotechnol* 2006 Oct; **7**(5): 315-321.
89. Nakajima H, Watanabe N, Shibata F, Kitamura T, Ikeda Y, Handa M. N-terminal region of CCAAT/enhancer-binding protein epsilon is critical for cell cycle arrest, apoptosis, and functional maturation during myeloid differentiation. *J Biol Chem* 2006 May 19; **281**(20): 14494-14502.
90. Naujokat C, Sezer O, Zinke H, Leclere A, Hauptmann S, Possinger K. Proteasome inhibitors induced caspase-dependent apoptosis and accumulation of p21WAF1/Cip1 in human immature leukemic cells. *Eur J Haematol* 2000 Oct; **65**(4): 221-236.
91. Nawrocki ST, Carew JS, Dunner K, Jr., Boise LH, Chiao PJ, Huang P, Abbruzzese JL, McConkey DJ. Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2005 Dec 15; **65**(24): 11510-11519.
92. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 1998 Jan 15; **17**(2): 384-395.

93. Passarge E. Genetik. In: Siegenthaler W (ed). *Klinische Pathophysiologie*, 8th edn. Thieme Verlag, Stuttgart New York 2000.
94. Price N, Dreicer R. Phase I/II trial of bortezomib plus docetaxel in patients with advanced androgen-independent prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* 2004 Dec; **3**(3): 141-143.
95. Promega. CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Technical Bulletin #245. [cited; Available from: <http://www.promega.com/tbs/tb245/tb245.pdf>
96. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 2007 Jun 29; **129**(7): 1337-1349.
97. Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol* 2005 Jan 20; **23**(3): 630-639.
98. Rape M, Jentsch S. Taking a bite: proteasomal protein processing. *Nat Cell Biol* 2002 May; **4**(5): E113-116.
99. Reed JC. Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. *Behring Inst Mitt* 1996 Oct; (97): 72-100.
100. Reed JC, Miyashita T, Takayama S, Wang HG, Sato T, Krajewski S, Aime-Sempe C, Bodrug S, Kitada S, Hanada M. BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem* 1996 Jan; **60**(1): 23-32.
101. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000 Nov; **157**(5): 1415-1430.
102. Reinstein E, Ciechanover A. Narrative review: protein degradation and human diseases: the ubiquitin connection. *Ann Intern Med* 2006 Nov 7; **145**(9): 676-684.
103. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, Rajkumar SV, Srkalovic G, Alsina M, Alexanian R, Siegel D, Orłowski RZ, Kuter D, Limentani SA, Lee S, Hideshima T, Esseltine DL, Kauffman M, Adams J, Schenkein DP, Anderson KC. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 2003 Jun 26; **348**(26): 2609-2617.

104. Richardson PG, Mitsiades C, Hideshima T, Anderson KC. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Annu Rev Med* 2006; **57**: 33-47.
105. Richon VM, Webb Y, Merger R, Sheppard T, Jursic B, Ngo L, Civoli F, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA. Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Jun 11; **93**(12): 5705-5708.
106. Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Mar 17; **95**(6): 3003-3007.
107. Ries L.A.G. EMP, Kosary C.L., Hankey B.F., Miller B.A., Clegg L., Mariotto A., Fay M.P., Feuer E.J., Edwards B.K. (ed). *SEER Cancer Statistics Review 1975-2000*. National Cancer Institute. Bethesda, MD, 2003.
108. Roboz GJ. Treatment of acute myeloid leukemia in older patients. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007 Mar; **7**(3): 285-295.
109. Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**: 739-779.
110. RxAbbott. Norvir highlights of prescribing information. [cited 02/2010]; Available from: http://www.rxabbott.com/pdf/norvirtab_pi.pdf
111. RxAbbott. Ritonavir Prescribing Information. [cited 02/2010]; Available from: http://www.rxabbott.com/pdf/norvirtab_pi.pdf
112. Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, Suzuki T, Tsuruo T, Nakanishi O. A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Apr 13; **96**(8): 4592-4597.
113. Sawyer DB, Fukazawa R, Arstall MA, Kelly RA. Daunorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is inhibited by dexrazoxane. *Circ Res* 1999 Feb 19; **84**(3): 257-265.
114. Sayers TJ, Brooks AD, Koh CY, Ma W, Seki N, Raziuddin A, Blazar BR, Zhang X, Elliott PJ, Murphy WJ. The proteasome inhibitor PS-341 sensitizes neoplastic cells to TRAIL-mediated apoptosis by reducing levels of c-FLIP. *Blood* 2003 Jul 1; **102**(1): 303-310.
115. Schaich M, Ehninger, G. Diagnostik und Therapie der akuten myeloischen Leukämie des Erwachsenen. *Onkologe* 2006; (12): 1003-1011.

116. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990 Dec 21; **63**(6): 1129-1136.
117. Shen J, Prywes R. Dependence of site-2 protease cleavage of ATF6 on prior site-1 protease digestion is determined by the size of the luminal domain of ATF6. *J Biol Chem* 2004 Oct 8; **279**(41): 43046-43051.
118. Sievers EL, Larson RA, Stadtmauer EA, Estey E, Lowenberg B, Dombret H, Karanes C, Theobald M, Bennett JM, Sherman ML, Berger MS, Eten CB, Loken MR, van Dongen JJ, Bernstein ID, Appelbaum FR. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol* 2001 Jul 1; **19**(13): 3244-3254.
119. Stapnes C, Doskeland AP, Hatfield K, Ersvaer E, Rynningen A, Lorens JB, Gjertsen BT, Bruserud O. The proteasome inhibitors bortezomib and PR-171 have antiproliferative and proapoptotic effects on primary human acute myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol* 2007 Mar; **136**(6): 814-828.
120. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, Grandin W, Lebwohl D, Wang Y, Cohen P, Fox EA, Neuberg D, Clark J, Gilliland DG, Griffin JD. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* 2005 Jan 1; **105**(1): 54-60.
121. Stone RM. Novel therapeutic agents in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 2007 Apr; **35**(4 Suppl 1): 163-166.
122. Suzuki T, Ando T, Tsuchiya K, Fukazawa N, Saito A, Mariko Y, Yamashita T, Nakanishi O. Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of new benzamide derivatives. *J Med Chem* 1999 Jul 29; **42**(15): 3001-3003.
123. Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992 May; **13**(5): 151-153.
124. Thomas X, Raffoux E, Elhamri M, Lobe I, Cannas G, Dombret H. Clofarabine for the treatment of adult acute myeloid leukemia. *Future Oncol* 2009 Oct; **5**(8): 1197-1210.
125. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 2000 Apr 28; **101**(3): 249-258.

126. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980 Aug; **26**(2): 171-176.
127. Vaux DL. Apoptosis timeline. *Cell Death Differ* 2002 Apr; **9**(4): 349-354.
128. Velcade. Velcade prescribing information [cited 09/2010]; Available from: http://www.velcade.com/Files/PDFs/VELCADE_PRESCRIBING_INFORMATION.pdf
129. Visekruna A, Joeris T, Schmidt N, Lawrenz M, Ritz JP, Buhr HJ, Steinhoff U. Comparative expression analysis and characterization of 20S proteasomes in human intestinal tissues: The proteasome pattern as diagnostic tool for IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 2009 Apr; **15**(4): 526-533.
130. Vogt C. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstetricians). Jent und Gassman, Solothurn 1842, pp 130.
131. Wang J, Hoshino T, Redner RL, Kajigaya S, Liu JM. ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Sep 1; **95**(18): 10860-10865.
132. Wang J, Maldonado MA. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol* 2006 Aug; **3**(4): 255-261.
133. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990 Apr 6; **248**(4951): 76-79.
134. Wikipedia. Wikipedia Strukturformel Daunorubicin. [cited 02/2010]; Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Daunorubicin>
135. Wikipedia. Wikipedia Tunicamycin Strukturformel. [cited 02/2010]; Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Tunicamycin>
136. Wikipedia. Wikipedia Natriumvalproate Strukturformel. [cited 02/2010]; Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Valproins%C3%A4ure>
137. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 2000 Dec; **6**(6): 1355-1364.

138. Zeng L, Zhou MM. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* 2002 Feb 20; **513**(1): 124-128.
139. Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* 2006 Jan 24; **66**(2 Suppl 1): S102-109.
140. Zhou H, Pandak WM, Jr., Lyall V, Natarajan R, Hylemon PB. HIV protease inhibitors activate the unfolded protein response in macrophages: implication for atherosclerosis and cardiovascular disease. *Mol Pharmacol* 2005 Sep; **68**(3): 690-700.

7 DANKSAGUNG

Mein Dank hinsichtlich des Gelingens dieser Dissertation gilt Prof. Dr. med. Christoph Driessen für die kollegiale Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, Dr. rer. nat. Michael Reich für die tatkräftige Hilfestellung im Labor und ganz besonders Dr. rer. nat. Marianne Kraus, die immer mit Herz und Verstand für Motivation und Lösungen gesorgt hat.

Für die stete Unterstützung in Studium und weit darüber hinaus möchte ich auch meiner bunten Familie sowie Jenny danken!