

Charakterisierung von Interleukin-16 als therapeutische Zielstruktur im Multiplen Myelom

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium -Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Julia Templin

aus Stendal

Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. med. W. FIEDLER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. U. WIENAND
Tag der Disputation: 06. Dezember 2013

Hamburg, den 14. November 2013



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Für meine liebe Oma

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
SUMMARY	VI
ZUSAMMENFASSUNG	VIII

1. Einleitung **1**

1.1 Das Multiple Myelom	1
1.1.1 Epidemiologie, Pathogenese, Symptomatik und Therapie des Multiplen Myeloms	1
1.1.2 Genetische Veränderungen und die Bedeutung der tumorassoziierten Mikroumgebung	3
1.1.3 Progressive Signalwege im Multiplen Myelom	6
1.1.4 Die Myelomstammzelle	7
1.2 Interleukin-16	9
1.2.1 Charakterisierung der Gen- und Proteinstruktur	9
1.2.2 Zelluläre Quellen und Zielmoleküle von Interleukin-16	11
1.2.3 Pleiotrope Funktion von Interleukin-16	13
1.3 Interleukin-16 im pathologischen Kontext	16
1.3.1 Interleukin-16 bei inflammatorischen Erkrankungen	16
1.3.2 Interleukin-16 bei malignen Erkrankungen	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit	22

2. Material und Methoden **23**

2.1 Material	23
2.1.1 Allgemein benötigte Geräte	23
2.1.2 Allgemein benötigte Verbrauchsmaterialien	24
2.1.3 Allgemein benötigte Reagenzien	24
2.1.4 Reagenzien für zellbiologische Methoden	25
2.1.4.1 Kultivierung von Zellen	25
2.1.4.2 Proliferationsassay	26
2.1.4.3 Viabilitätsassay	26
2.1.4.4 Colony Formation Assay	26
2.1.4.5 Herstellung und Anwendung lentiviraler Vektoren	26
2.1.5 Reagenzien für molekularbiologische Methoden	27
2.1.6 Reagenzien für proteinbiochemische Methoden	30
2.1.6.1 SDS-PAGE und Western Blot	30
2.1.6.2 ELISA und ELISPOT	31
2.1.6.3 Caspase-3 Aktivitätstest	31
2.1.7 Reagenzien für die Durchflusszytometrie	31
2.1.8 Verwendete Software	32
2.2 Zellbiologische Methoden	32
2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen	32
2.2.1.1 Kultivierung und Passagieren von Zelllinien	32
2.2.1.2 Isolieren und Kultivieren von Lymphozyten	33
2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	34
2.2.1.4 Zellzahlbestimmung	34

2.2.2	Proliferationsassay	35
2.2.3	Viabilitätsassays	35
2.2.4	Colony Formation Assay	36
2.2.5	Life Cell Imaging	37
2.2.6	Herstellung lentiviraler Partikel	37
2.2.6.1	Calciumphosphat-Transfektion zur Produktion lentiviraler Partikel	38
2.2.6.2	Titration lentiviraler Partikel	39
2.2.7	Lentivirale Transduktion von Zielzellen	40
2.3	Molekularbiologische Methoden	40
2.3.1	RNA-Isolierung	40
2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40
2.3.3	Überprüfung der RNA-Qualität	41
2.3.4	Reverse Transkription	41
2.3.5	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion	42
2.3.6	Genexpressionsanalyse mittels Microarray	43
2.3.6.1	Praktische Durchführung der Microarray-Analysen	44
2.3.6.2	Bioinformatische Auswertung der Microarray-Analysen	44
2.3.7	Signalwegfokussierte Genexpressionsanalyse mittels PCR Array	45
2.3.8	Klonierungen	46
2.3.8.1	Präparation genomischer DNA	46
2.3.8.2	Präparation von Plasmid-DNA	46
2.3.8.3	Plasmidsequenzierungen	46
2.3.8.4	Verwendung von Restriktionsendonukleasen	47
2.3.8.5	Agarosegelelektrophorese	47
2.3.8.6	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	47
2.3.8.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	47
2.3.8.8	Aufreinigung von PCR-Amplifikaten	48
2.3.8.9	Ligation von DNA-Fragmenten	49
2.3.8.10	Transformation kompetenter Bakterien	49
2.3.8.11	Ansetzen von Mini- und Maxikulturen von Bakterien	49
2.3.8.12	Klonierungsstrategien	50
2.4	Proteinbiochemische Methoden	51
2.4.1	SDS-PAGES und Western Blot	51
2.4.2	ELISA	54
2.4.3	ELISPOT	54
2.4.4	Caspase-3 Aktivitätsassay	55
2.5	Durchflusszytometrische Methoden	55
2.6	Statistische Auswertung	58
3.	Ergebnisse	59
3.1	Charakterisierung der Interleukin-16 Expression und Sekretion im Multiplen Myelom	59
3.1.1	Intrazelluläre Interleukin-16 Expressionsanalysen	59
3.1.1.1	Myelomzellen weisen eine hohe Interleukin-16 Genaktivität auf	59
3.1.1.2	Die Expression von Interleukin-16 ist zyklisch reguliert	62
3.1.2	Das Sekretionsverhalten der Myelomzellen	65
3.1.2.1	Myelomzellen sekretieren bioaktives Interleukin-16	65
3.1.2.2	Myelomzellen zeigen eine konstitutive Prozessierung des Vorläuferproteins zu bioaktivem Interleukin-16	67

3.2	Identifizierung des Einflusses von Interleukin-16 auf die biologischen Prozesse der Myelomzellen	71
3.2.1	Validierung der shRNAmir-vermittelten Herunterregulierung der IL-16-Expression	71
3.2.1.1	Myelomzellen eignen sich zur effizienten lentiviralen Transduktion	72
3.2.1.2	Der shRNAmir-vermittelte Interleukin-16-Knockdown erreicht hohe Effizienzen	73
3.2.2	Die Auswirkung von Interleukin-16 auf die Genexpressionsprofile von Myelomzellen	76
3.2.2.1	Interleukin-16 reguliert differenziell die Genexpression in Myelomzellen	77
3.2.2.2	Interleukin-16 beeinflusst potentiell die Proliferation, Viabilität, Apoptose und Differenzierung von Myelomzellen	79
3.3	Funktionelle Validierung des postulierten Einflusses von Interleukin-16	82
3.3.1	Interleukin-16 begünstigt das Wachstum von Myelomzellen	83
3.3.1.1	Die Abwesenheit von Interleukin-16 führt zur verminderter Proliferation	83
3.3.1.2	Das Proliferationsverhalten korreliert mit der Sekretion von bioaktivem Interleukin-16	86
3.3.2	Interleukin-16 ist bedeutend für die S-Phase-G ₂ -Phase-Transition im Zellzyklus	87
3.3.2.1	Interleukin-16 beeinflusst den Zellzyklusphasenverteilung	87
3.3.2.2	Die Interleukin-16-Proteinexpression ist in den verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedlich stark ausgeprägt	90
3.3.3	Interleukin-16 stimuliert die Aktivierung mehrerer Proliferationssignalwege	93
3.3.4	Interleukin-16 unterstützt den Selbsterneuerungsprozess klonaler Vorläuferzellen des Multiplen Myeloms	97
3.3.5	Interleukin-16 hat keine maßgebliche Bedeutung für den programmierten Zelltod	99
3.3.6	Interleukin-16 nimmt positiven Einfluss auf die Viabilität der Myelomzellen	103

4. Diskussion **106**

4.1	Aberrante Interleukin-16-Expression und -Sekretion der malignen Plasmazellen sind verantwortlich für die hohen Interleukin-16-Serumkonzentrationen im Multiplen Myelom	106
4.1.1	Myelomzellen exprimieren verstärkt Interleukin-16	106
4.1.2	Myelomzellen produzieren und sekretieren konstitutiv bioaktives Interleukin-16	108
4.2	Interleukin-16 beeinflusst signifikant die Tumorprogression des Multiplen Myeloms	111
4.2.1	Myelomzellen reagieren sensitiv auf den Entzug von Interleukin-16 mit einer Veränderung ihres Expressionsprofils	111
4.2.2	Interleukin-16 unterstützt die Proliferation und das Überleben von neoplastischen Plasmazellen	113
4.2.2.1	Interleukin-16 stimuliert autokrin das Wachstum der Myelomzellen und deren Viabilität	113
4.2.2.2	Interleukin-16 besitzt die Fähigkeit zur parakrinen Wachstumsförderung	116
4.2.3	Interleukin-16 beeinflusst maßgeblich den Selbsterneuerungsprozess der Myelomvorläuferzellen	118
4.3	Ausblick	119

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
LITERATURVERZEICHNIS	IX
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	XXIX
PUBLIKATIONSLISTE	XXX
DANKSAGUNG	XXXI

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: INTERLEUKIN-16-MRNA UND PROTEINEXPRESSION IN MYELOMZELLINIEN.....	60
ABBILDUNG 2: ANTEIL IL-16-EXPRIMIERENDER MYELOMZELLEN INNERHALB EINER ZELLINIE	61
ABBILDUNG 3: ZYKLISCHE REGULATION DER INTERLEUKIN-16-EXPRESSION	63
ABBILDUNG 4: INTERLEUKIN-16-SEKRETION DURCH ZELLEN DES MULTIPLLEN MYELOMS.....	66
ABBILDUNG 5: PROZESSIERUNG VON PRO-INTERLEUKIN-16 ZUR BIOAKTIVEN FORM	69
ABBILDUNG 6: ERMITTLUNG DER TRANSDUKTIONSEFFIZIENZ VON MYELOMZELLINIEN	73
ABBILDUNG 7: ÜBERPRÜFUNG DER INTERLEUKIN-16-KNOCKDOWN-EFFIZIENZ	75
ABBILDUNG 8: KINETIK DES shRNAMIR-VERMITTELTEN INTERLEUKIN-16-KNOCKDOWN	76
ABBILDUNG 9: CLUSTERANAYLSE DIFFERENZIELL REGULierter GENE NACH INTERLEUKIN-16-KNOCKDOWN.....	78
ABBILDUNG 10: REDUZIERTES WACHSTUMSVERHALTEN DER IL-16-KNOCKDOWN-ZELLEN	84
ABBILDUNG 11: PROLIFERATIONSASSAY NACH IL-16-KNOCKDOWN	85
ABBILDUNG 12: KORRELATION VON ZELLPROLIFERATION UND IL-16-SEKRETION IN MYELOMZELLEN	86
ABBILDUNG 13: GATINGSHEMA ZUR ERMITTLUNG DER ZELLYKLUSPHASENVERTEILUNG NACH IL-16-KNOCKDOWN	88
ABBILDUNG 14: EINFLUSS VON IL-16 AUF DEN ZELLYKLUSPROGRESS	89
ABBILDUNG 15: GATINGSHEMA ZUR QUANTIFIZIERUNG DER IL-16-EXPRESSION IN DEN VERSCHIEDENEN ZELLYKLUSPHASEN	91
ABBILDUNG 16: ZELLYKLUSPHASENABHÄNGIGE EXPRESSION VON IL-16	92
ABBILDUNG 17: EINFLUSS VON INTERLEUKIN-16 AUF VERSCHIEDENE PROLIFERATIONSSIGNALWEGE	96
ABBILDUNG 18: DIE BEEINFLUSSUNG VON INTERLEUKIN-16 AUF DIE KOLONIEFORMUNG DER MYELOMZELLEN...	98
ABBILDUNG 19: GATINGSTRATEGIE ZUR ERMITTLUNG DES EINFLUSSES VON INTERLEUKIN-16 AUF DEN ZELLTOD	100
ABBILDUNG 20: ERMITTLUNG DES EINFLUSSES VON INTERLEUKIN-16 AUF DEN ZELLTOD	102
ABBILDUNG 21: EINFLUSS VON INTERLEUKIN-16 AUF DIE ZELLVIABILITÄT	104

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: ZUSAMMENSETZUNG DES REAKTIONSANSATZ FÜR DIE REVERSE TRANSKRIPTION.....	41
TABELLE 2: ZUSAMMENSETZUNG DES REAKTIONSANSATZES FÜR DIE Q-RT-PCR	42
TABELLE 3: TEMPERATURPROFIL DER Q-RT-PCR	42
TABELLE 4: ZUSAMMENSETZUNG DES REAKTIONSANSATZES FÜR DEN Q-RT-PCR-BASIERTEN SUPERARRAY.....	45
TABELLE 5: TEMPERATURPROFIL DER PCR ARRAY DES Q-RT-PCR-BASIERTEN SUPERARRAY	46
TABELLE 6: REAKTIONSANSATZ EINER POLYMERASEKETTENREAKTION MIT DER TAQ-POLYMERASE	48
TABELLE 7: REAKTIONSANSATZ EINER POLYMERASEKETTENREAKTION MIT DER PWO-POLYMERASE	48
TABELLE 8: SIGNIFIKANT MODULIERTE GENEXPRESSION BEI IL-16-NEGATIVEN ZELLEN	77
TABELLE 9: BIOLOGISCHE EFFEKTE DURCH HERUNTERREGULATION VON INTERLEUKIN-16 IN AMO-1	80
TABELLE 10: BIOLOGISCHE EFFEKTE DURCH HERUNTERREGULATION VON INTERLEUKIN-16 IN RPMI-8226.....	81
TABELLE 11: VERWENDETE BEDINGUNGEN FÜR DIE VALIDIERUNG DES EINFLUSSES VON IL-16 AUF VERSCHIEDENE FUNKTIONELLE SYSTEME.....	82
TABELLE 12: WACHSTUMSVERHALTEN DER MYELOMZELLEN NACH IL-16-KNOCKDOWN	84
TABELLE 13: ³ H-THYMIDIN-INKORPORATION ALS MAß DER REPLIKATIONSFREQUENZ VON MYELOMZELLEN NACH IL-16-KNOCKDOWN	85
TABELLE 14: ZUORDNUNG VERSCHIEDENER GO-TERMS ZU EINER FUNKTIONELLEN KATEGORIE	94

SUMMARY

Multiple myeloma is a hematological malignancy, which emerges from a deregulated plasma cell located in the bone marrow. Even though several new and effective modes of therapy have been introduced for the treatment of myeloma, the disease is characterized by a high rate of relapses and therefore still considered incurable. Interestingly, IL-16 expression levels correlate positively with the severity of the disease and a poor outcome of the patients. Hence, the aim of the current study was to investigate whether the molecular function of IL-16 is associated with the progression of myeloma.

The first part of this study demonstrates that IL-16 gene expression and IL-16 protein biosynthesis is upregulated in myeloma cells. Further, a periodicity in its expression pattern could be observed which indicates a cyclic regulation of IL-16 production. Myeloma cells demonstrated an aberrant and deregulated secretion of bioactive IL-16 leading to highly increased levels of this cytokine in the extra cellular space. Experiments investigating the activity of Caspase-3 and its correlation with processed and released IL-16 suggested the abnormal IL-16 secretion pattern is based on permanent basal activity of this protease. The majority of cells that were tested positive for intracellular IL-16 expression were able to secrete the mature cytokine independently of external activation stimuli.

The second part of the current study describes the development of a reliable knock down system for effective repression of IL-16 production. Using this approach whole gene expression profiles of IL-16 positive and IL-16 negative myeloma cells were explored. By comparing both groups it was shown that IL-16 promotes the cell growth of myeloma cells. Furthermore, IL-16 contributed to cell viability and inhibited tumor cell differentiation. Myeloma cells of advanced stages of the disease were affected most by the loss of IL-16 expression.

Additional analyses were performed to confirm gene expression profiles determined by micro array studies. As indicated in the previous part, IL-16 proved to be a contributing factor of myeloma cell proliferation. In particular, IL-16 had an impact on cell cycle progression during S-phase-G₂-phase transition. The cytokine mediated its tumor-promoting effect by activating the prominent proliferation pathways of PI3-Kinase, NFκB and MAP-Kinases. Furthermore, it upregulated important growth stimulating factors implicated in the pathogenesis of multiple myeloma. Additionally, the postulated positive effect of IL-16 on cell viability was confirmed

by functional assays. Importantly, IL-16 knock down was shown to dramatically reduce the clonogenic growth of myeloma precursor cells, which are suspected to be responsible for the high rate of relapses in myeloma patients.

By identifying the strong effects of IL-16 on the progression of multiple myeloma the well established function of IL-16 as a chemotactic factor and immunomodulator could be extended in an oncological context for the first time. These results underline its potential as a therapeutic target structure for the treatment of multiple myeloma.

ZUSAMMENFASSUNG

Trotz der Einführung innovativer therapeutischer Wirkstoffe zur Bekämpfung des Multiplen Myeloms ist die knochenmarkresidierende Plasmazellneoplasie durch eine hohe Rückfallquote geprägt, die in einem aggressiven Phänotyp mit inhärenten Chemoresistenzmechanismen begründet liegt und mit geringen Überlebenserwartungen einhergeht. In vorläufigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Tumorprogression des Multiplen Myeloms an eine erhöhte IL-16-Serumkonzentration geknüpft ist. Ziel dieser Arbeit war daher, die biologische Funktion von IL-16 in der malignen Plasmazelle zu identifizieren und zu untersuchen, inwiefern das Cytokin die Pathogenese des Multiplen Myeloms beeinflusst.

Im ersten Teil der Arbeit erfolgten IL-16-Expressionsanalysen in Myelomzellen, die eine starke IL-16-Genaktivität und eine hohe IL-16-Proteinbiosyntheserate aufzeigten. Besonders auffällig war dabei eine Periodizität der IL-16-Expressionsmuster, die auf eine zyklische Regulation hindeutet. Weiterhin wurde ein dereguliertes Sezernierungsverhalten der Myelomzellen beobachtet, was zur massiven IL-16-Anreicherung im extrazellulären Raum führte. Korrelations- und Aktivitätsstudien zeigten, dass das aberrante Sekretionsmuster der Myelomzellen vermutlich auf eine permanente Caspase-3-Aktivität zurückzuführen ist. Jene Zellen, für die eine IL-16-Expression nachgewiesen werden konnte, sekretierten die biologisch aktive Form des Cytokins unabhängig von der Aktivierung durch externe Stimuli.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein System etabliert, das einen verlässlichen IL-16-Knockdown innerhalb der Myelomzellen gewährleistet. Basierend auf diesem System wurden genomweite Expressionsprofile IL-16-positiver und IL-16-negativer Myelomzellen mittels Microarray-Analysen erfasst und ein funktioneller Beitrag von IL-16 auf die Proliferationsförderung, Hemmung der Zelldifferenzierung sowie der positiven Einflussnahme auf die Zellviabilität abgeleitet. Myelomzellen eines weit fortgeschrittenen Stadiums reagierten dabei am sensibelsten auf den Verlust von IL-16.

Weiterführende Analysen dienten der funktionellen Bestätigung der hergeleiteten Effekte. Dabei zeichnete sich eine signifikante Relevanz von IL-16 für das Wachstumsverhalten der Myelomzellen ab. Insbesondere schien dabei die Zellzyklusprogression von der S-Phase zur G₂-Phase betroffen zu sein. Den positiven Effekt auf die Tumorzellproliferation vermittelte IL-16 über die Stimulierung der PI3-Kinase-, NFκB- und MAP-Kinase-Signalkaskaden sowie der Hochregulierung prominenter wachstumsstimulierender Faktoren des Multiplen Myeloms.

Weiterhin konnte der anhand der Microarray-Analysen postulierte positive Effekt von IL-16 auf die Zellviabilität in einem funktionellen Assay bestätigt werden. Besonders interessant war die Beobachtung, dass der Verlust von IL-16 zur drastischen Hemmung des klonalen Wachstums von Vorläuferzellen des Multiplen Myeloms führte. Dadurch kann eine große Bedeutung des Cytokins für den Selbsterneuerungsprozess der neoplastischen Zellen abgeleitet werden, die für die hohen Rezidivraten im Multiplen Myelom verantwortlich zu sein scheinen.

Durch die Identifizierung des tumorprogressiven Effekts von IL-16 im Multiplen Myelom wurde die bekannte physiologische Funktion des Cytokins als chemotaktischer Faktor und Immunmodulator erstmals um die Relevanz im onkologischen Kontext erweitert. Die vorgestellten Ergebnisse unterstreichen das Potential von IL-16, als eine therapeutisch relevante Zielstruktur in der Behandlung des Multiplen Myeloms zu fungieren.

1. Einleitung

1.1 Das Multiple Myelom

1.1.1 Epidemiologie, Pathogenese, Symptomatik und Therapie des Multiplen Myeloms

- Epidemiologie

Das Multiple Myelom erwächst sich aus einer zunächst asymptomatischen, pre-malignen Proliferation einer monoklonalen Plasmazelle in der Mikroumgebung des Knochenmarks. Innerhalb neoplastischer Leiden übernimmt das Multiple Myelom einen Anteil von 1 % und zählt mit ca. 13 % zur zweithäufigsten hämatologischen Tumorerkrankung. Innerhalb der Gruppe der B-Zelltumore ist das Multiple Myelom mit einer Inzidenzrate von 5,6/100.000 Individuen am stärksten vertreten. Die Inzidenzrate ist bei afrikanischstämmigen Amerikanern und Bewohnern der pazifischen Inseln am höchsten. Asiaten sind dahingegen seltener betroffen. Das mediane Alter des Multiplen Myeloms liegt bei 70 Jahren. 37 % der diagnostizierten Patienten sind jünger als 65 Jahre, die 65-74-jährigen machen einen Anteil von 26 % aus und 37 % der Diagnostizierten sind älter als 75 Jahre.¹ Die Ätiologie des Multiplen Myeloms ist noch immer unbekannt. Es wird vermutet, dass genetische Defekte in B-Zellen die Anfälligkeit dieser Zellen gegenüber umweltbedingten Toxinen verursacht. Die Belastung mit radioaktiver Strahlung, Pestiziden oder beruflich bedingter Kontakt zu Schwermetallen stehen im Verdacht, die Herausbildung des Multiplen Myeloms zu begünstigen.²

- Pathogenese

Der Krankheitsverlauf lässt sich in mehrere Stadien unterteilen. Die erste Phase umfasst die Etablierung der nicht-malignen monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), in der eine Immortalisierung des Plasmazellklons, nicht jedoch dessen Transformation erfolgt. Eine Akkumulation der Plasmazelle sowie die klinische Symptomatik bleiben aus. Der Übergang zum Multiplen Myelom erfolgt über eine asymptomatische Zwischenstufe, auch bekannt als Smoldering Myelom. Serum und Urin dieser Patienten weisen eine erhöhte Konzentration monoklonaler Immunglobuline auf, die als M-Protein oder Paraprotein bezeichnet werden und auf die erhöhte Anzahl identischer Plasmazellen zurückzuführen sind. Die Transformation der Plasmazellen hat stattgefunden und deren Proliferationsrate ist angestiegen. Der Anteil der Plasmazellen im Knochenmark liegt in diesem Stadium bei > 10 %.

In der weiteren Krankheitsprogression erhöht sich die Proliferationskapazität zunehmend, was mit stets steigenden Plasmazellzahlen im Knochenmark einhergeht. Dieses Stadium wird mit einer Vielzahl an Beschwerden begleitet und wird daher als symptomatisches Myelom bezeichnet. Die Lokalisation des Multiplen Myeloms im Knochenmark ist ein Hauptmerkmal dieser Tumorentität. Nur sehr selten und erst in einer sehr späten Phase des Krankheitsverlaufs findet eine Streuung in andere Körperregionen statt. In dieser Phase der Pathogenese wird die Neoplasie als Plasmazelleukämie bzw. als Plasmozytom bezeichnet und weist einen aggressiven Phänotyp auf.²⁻⁴

- Symptomatik

Zu den am häufigsten beobachteten klinischen Manifestationen zählen die Knocheninstabilität, Hypercalcämie, Niereninsuffizienz, Anämien sowie ein erhöhtes Infektionsrisiko. Die Hypercalcämie und die erhöhte Anfälligkeit gegenüber Knochenbrüchen liegt in der Aktivierung der Osteoclasten und simultaner Reduktion der Osteoblasten begründet. Die exzessive Sekretion monoklonaler Immunglobuline (Paraprotein, M-Protein) sowie nichtfunktioneller, freier leichter Ketten durch die maligne Plasmazelle führt zu einer überlastungsbedingten Schädigung der Nierentubuli. Gepaart mit der Hypercalcämie löst es das Nierenleiden der Myelompatienten aus.⁵ Die Anämie bildet sich durch die aggressive Plasmazellexpansion im Knochenmark aus, wodurch die normale Erythropoese verdrängt wird. Der für nicht-maligne Immunzellen inhibierende Cytokinsturm sowie die funktionell fehlerhaften Immunglobuline der neoplastischen Zellen verursachen eine erhöhte Infektionsanfälligkeit der Myelompatienten.² Weiterhin sind Abnormitäten des T-Lymphozytenphänotyps zu beobachten, die ebenfalls zu einer reduzierten Immunabwehr führen können.⁶

- Therapeutische Maßnahmen

Das Multiple Myelom gilt bis heute als eine nicht heilbare Tumorerkrankung. Dabei wird die MGUS nicht als Krankheitsphase definiert, sondern als eine Veränderung in den Blutwerten. Daher findet keine Behandlung statt. Jedoch werden bei den Betroffenen die Paraproteinkonzentrationen zunächst in dreimonatigen Abständen, später je nach Auffälligkeiten nach 6 – 24 Monaten überprüft.⁷ Patienten des Smoldering Myeloms durchlaufen ein regelmäßiges Monitoring im Abstand von 1-2 Monaten, um die klinische Manifestation zu beobachten. Diese Patienten erhalten keine Chemotherapie, da sie sich in

dem Stadium nicht als vorteilhaft erwiesen hat.⁸ Die Behandlung des symptomatischen Myeloms mit innovativen chemotherapeutischen Substanzen, wie beispielsweise Bortezomib, Lenalidomid und Thalidomid, haben die Überlebensraten der Patienten deutlich verbessert.⁹ Patienten mit einem Multiplen Myelom werden mit einer Kombinationstherapie behandelt, deren Zusammenstellung sich nach dem individuellen Phänotyp des Patienten richtet. Es werden Steroide (Dexamethason, Prednison), alkylierende Substanzen (Melphalan, Cyclophosphamid), Immunmodulatoren (Lenalidomid, Thalidomid), Proteasominhibitoren (Bortezomib) und Anthracycline (Doxorubicin, Liposomal Doxorubicin) eingesetzt.¹⁰⁻¹³ Da die Therapieerfolge der Kombinationstherapien nicht zufriedenstellend sind, gilt die zusätzliche Durchführung einer autologen Stammzelltherapie (ASCT, *autologous progenitor (stem) cell transplantation*) als Standardbehandlung des Multiplen Myeloms, sofern die klinische Verfassung des Patienten den Anforderungen entspricht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Therapieform die mittlere Überlebensrate auf 5 - 7 Jahre verlängern kann.¹⁴

1.1.2 Genetische Veränderungen und die Bedeutung der tumorassoziierten Mikroumgebung

Charakteristisch für die maligne Plasmazelle des Multiplen Myeloms ist ein stark alterierender, instabiler Karyotyp. Beispielsweise fehlen ganze Chromosomen oder sie sind vervielfältigt. Der Ploidiestatus schwankt häufig während des Krankheitsverlaufs.^{15,16} Weiterhin treten mehrfach Translokationen auf, die zur Deregulation der Gene an den Bruchstellen führen. Translokationen betreffen häufig die Immunglobulinregionen auf Chromosom 14q32.3 (Immunglobulin H) sowie Chromosom 2p12 (Immunglobulin L, κ) oder Chromosom 22q11 (Immunglobulin L, λ). Jenes veranlasst die Nebeneinanderstellung von verschiedensten Genen in die Nähe eines verstärkenden Elements der Immunglobulintranskription. Translokationen, die eine stark erhöhte Cyclinexpression zur Folge haben, sind in 15-20 % (Cyclin D1) bzw. 5 % (Cyclin D3) der Myelompatienten zu beobachten.¹⁷⁻¹⁹ Weitere, in der frühen Phase der Pathogenese häufig betroffene Gene sind MAF (Basic-leucine Zipper Transkriptionfaktor), MAFB (Basic-leucine Zipper Transkriptionfaktor), MMSET (Homolog der Histon-Methyltransferase) und FGFR3 (Rezeptor—Tyrosin-Kinase).²⁰⁻²² Translokationen und Mutationen, die meistens mit einem fortgeschrittenen Krankheitsverlauf assoziiert sind, verursachen die Progression von MGUS zum Multiplen Myelom und zur Plasmazellleukämie. Die Aktivierung von MYC, NRAS und KRAS sowie eine Inaktivierung der cyclinabhängigen

Kinaseinhibitoren CDKN2A und CDKN2C und des Tumorsuppressors PTEN sind verstärkt in den späteren Krankheitsphasen zu beobachten.^{22–26}

Nicht nur genetische Veränderungen bestimmen das biologische Verhalten der Myelomzellen. Auch epigenetische Regulationen in Form von microRNA Expression sowie Modifikationen im Methylierungsstatus von Genen, oder Alterationen der Transkript- und Proteinlevel beeinflussen maßgeblich den neoplastischen Phänotyp des Multiplen Myeloms.²⁷ Ausgelöst werden sie zumeist durch die rege Interaktion der Multiplen Myelomzelle mit den Komponenten und Zellen ihrer Mikroumgebung. Zu dieser Mikroumgebung zählen Proteine der extrazellulären Matrix (ECM, *extra cellular matrix*) (z. B. Fibronectin, Collagen, Laminin, Osteopontin), hämatopoetische Stammzellen, Immunzellen, Erythrozyten, Knochenmarkstromazellen (BMSCs, *bone marrow stroma cells*), Knochenmarkendothelzellen (BMECs, *bone marrow endothelial cells*) sowie Osteoclasten und Osteoblasten.^{28–32}

Die akzessorischen Zellen im Tumormilieu versorgen die Zellen des Multiplen Myelom mit ihren wichtigsten Wachstumsfaktoren Interleukin-6 (IL-6), *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *B-cell activating factor* (BAFF), *fibroblast growth factor* (FGF), *stromal cell-derived factor 1 α* (SDF1 α) und *tumor necrosis factor α* (TNF α).^{31–43}

Die Interaktion der Tumorzelle mit ihrer Mikroumgebung führt zur verstärkten Ausschüttung dieser Mitogene und unterstützt auf diese Weise das Wachstum, Überleben, Migration und die Resistenz der neoplastischen Zellen gegenüber Chemotherapeutika.^{44,45} Darüber hinaus wird die Zellorganisation durch die starke Aktivierung der Osteoclastogenese^{46,47} und der Angiogenese^{48,49} maßgeblich beeinflusst.

Insbesondere der Kontakt zwischen Myelomzellen und BMSCs führt zur Hochregulation der Expression von TNF α , TGF β und VEGF in der Myelomzelle. Diese sezernierten Cytokine stimulieren zum einen die verstärkte Bildung von IL-6 durch die BMSCs, und zum anderen eine verstärkte Oberflächenexpression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf beiden Interaktionspartnern, die ihrerseits die beschriebenen Effekte erneut verstärken.^{50–52} Die essentiellen Adhäsionsmoleküle für den Zell-Zellkontakt von Myelomzelle (erstgenanntes Molekül) und BMSC (zweitgenanntes Molekül) sind CD40-CD40L, VCAM-VLA-4 und MUC-ICAM. Diese Interaktionen veranlassen zusätzlich eine erhöhte Expression von IL-6, IGF1 und VEGF durch die Myelomzelle, zur autokrinen Sekretion.^{53–56}

Die Wechselwirkung zwischen den Myelomzellen und den BMECs ist der Hauptaktivator der tumorassoziierten Angiogenese, um die Tumorzellen und deren unterstützendes Milieu mit

ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Über die Adhäsion werden in der Myelomzelle intrazellulär Signale zur Expression und Sekretion von VEGF, bFGF und MMP weitergeleitet. Diese Moleküle fördernd maßgeblich die Gefäßneubildung. Die BMECs hingegen erhalten Signale zur Ausschüttung der Wachstumsfaktoren IL-6, IGF und VEGF. Dadurch wird gleichzeitig die Proliferation der Myelomzelle sowie die Entstehung weiterer BMECs für die Gefäßbildung angeregt. Die neuen BMECs in den myelomassoziierten Gefäßen können wiederum tumorunterstützende Faktoren sekretieren.^{53,57-59}

Ebenfalls wichtige Ereignisse in der Pathogenese des Multiplen Myeloms liefert die Interaktion der Osteoblasten und Osteoclasten mit den BMSCs und den Tumorzellen. Die Myelomzelle stimuliert die BMSCs zur Produktion von *receptor activator of NFκB lignd* (RANKL) und IL-6, zwei Botenstoffe, welche die Osteoclastogenese einleiten. Eine nicht mit der Tumorzelle interagierende BMSC dahingegen sezerniert den RANKL-Gegenspieler Osteoprotegerin (OPG). In der malignen Mikroumgebung herrscht demnach ein Ungleichgewicht zwischen RANKL und OPG zugunsten der Osteolyse, da die Osteoblasten abgebaut und die Osteoclasten gebildet werden.^{60,61} Die Osteoclastenformierung im Tumorumfeld wird unabhängig von RANKL zusätzlich durch MIPα begünstigt, ein Differenzierungsfaktor, der durch die Myelomzellen ausgeschüttet wird. Simultan sezerniert die maligne Plasmazelle den löslichen Faktor Dickkopf-1 (DKK1), der die Differenzierung der Osteoblastenvorläuferzelle hemmt.⁶² Ein Missverhältnis zwischen Osteoclasten und Osteoblasten begünstigt das Überleben der Tumorzelle, da die Osteoclasten die Versorgung des tumorfördernden Interaktionsnetzwerks der akzessorischen Zellen mit weiteren wichtigen Cytokinen, z. B IL-1β, IL-6, VEGF und HGF sicherstellen.⁶³

Die Ausführungen über die rege Interaktion der Myelomzelle mit ihrer Mikroumgebung im Knochenmark unterstreicht die entscheidende Mitwirkung nicht-maligner Zellen an der Tumorprogression. Im Multiplen Myelom führen diese Interaktionen zu massiven Cytokinsezernierungen, die in autokrinen und parakrinen, positiv regulierten Feedbackschleifen die Expression weiterer tumorunterstützender Faktoren auslösen und dadurch das Wachstum, das Überleben, die Adhäsion, die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und die Angiogenese fördern.

1.1.3 Progressive Signalwege im Multiplen Myelom

An der Herausbildung, dem Fortbestehen und der Progression der Plasmazellneoplasie sind maßgeblich fünf Signalwege beteiligt, zu denen der PI3-Kinase-, NFκB-, Ras/MAP-Kinase-, JAK/STAT3- und der NOTCH-1 Pathway zählen. Insbesondere werden sie durch den Zell-Zellkontakt über die Adhäsionsmoleküle oder aber über die im hohen Maße ausgeschütteten Wachstumsfaktoren aktiviert und veranlassen das Wachstum, das Überleben, die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und die Produktion weiterer tumorfördernder Cytokine. Die externen Stimuli entfalten ihre Wirkung zumeist durch die simultane Aktivierung mehrerer Signalwege. Beispielsweise induziert die Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor (IL-6R) die Proliferation der Myelomzellen durch die Aktivierung der Ras/MAP-Kinase⁶⁴, JAK/STAT3⁶⁵⁻⁶⁷ und PI3-Kinase^{68,69} Signalwege. Die Stimulierung der zwei letztgenannten Signalwege induziert gleichzeitig Überlebenssignale, welche das Zellsterben unterbinden. Eine zentrale Bedeutung kommt dabei der GTPase Ras zu. Sie überträgt einerseits Proliferationssignale durch die Aktivierung der Raf-MAP-Kinase Kaskade, kann aber gleichzeitig Überlebens- und Wachstumssignale über PI3-Kinase/Akt und NFκB transduzieren.^{70,71} Synergistisch zu IL-6 fördert auch IGF-1 die Proliferation und das Überleben der malignen Plasmazelle durch Aktivierung des PI3- und MAP-Kinase Pathways.⁷²⁻⁷⁴

Der Raf-MEK-ERK Signalweg ist eine spezielle Kaskade innerhalb des MAP-Kinase Pathways. Er wird insbesondere durch die Bindung von VEGF an seinen Rezeptor, aber auch durch IL-6 und IGF-1 stimuliert. Dadurch wird in der Myelomzelle eine Expressionsverstärkung anti-apoptotischer Proteine (z. B. Mcl-1, Survivin, cIAP) induziert, eine erhöhte Chemoresistenz vermittelt und die Proliferationskapazität vergrößert. Die mitogene Wirkung der MAP-Kinase Kaskade ist im Multiplen Myelom auf eine erhöhte Transkriptionsrate von IL-6, VEGF und MIP-α zurückzuführen.⁷⁵⁻⁷⁷

Die durch IL-6, IGF-1, VEGF und bFGF aktivierte PI3-AKT Signalkaskade erzielt ihren anti-apoptotischen und proliferativen Effekt in den Myelomzellen durch Herunterregulation des pro-apoptotischen Proteins Bad und den Abbau pro-apoptotischer Forkhead Transkriptionsfaktoren sowie der Hochregulation von NFκB, mTOR, p70^{S6K}, 4E-BP-1 und MDM. Darüber hinaus entwickelt die Myelomzelle dadurch eine Insensitivität gegenüber Chemotherapeutika oder einem IL-6 Entzug.^{69,71,73,74,76,78,79}

Der in der Myelomzelle stimulierte JAK/STAT-Signalweg mündet in der Expressionsverstärkung der Überlebensproteine Bcl-2 und Mcl-1. Erhöhte Level an Mcl-1 und Cyclin-D1 infolge der

JAK/STAT3-Aktivierung fördern auch die Proliferation. Hauptstimulator des JAK/STAT3-Pathways der Myelomzelle ist dabei IL-6.^{65,67,77,80–83}

Die Interaktion zwischen den Myelomzellen und den BMSC sowie der ECM erzielt ihre progressive Wirkung über die Aktivierung des NFκB und NOTCH-1 Pathways, die sowohl Überlebens- und Proliferationssignale, als auch die zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz (CAM-DR, *cell adhesion-mediated drug resistance*) nach sich zieht. Die NFκB-Signalkaskade wird speziell über die Bindung von CD40 an seinen Liganden CD40L ausgelöst. Zusätzlich induzieren IL-6, VEGF und die Bindung an Fibronectin die Aktivierung des Pathways. Zielmoleküle des aktivierten Transkriptionsfaktors NFκB, die einen direkten Effekt auf das Überleben der Zelle ausüben, sind Bcl-2, Bcl-XL, Bfl-1 und Mcl-1 sowie cIAP1/2, c-FLIP und Survivin.^{84–89} Zu den pro-proliferativen Zielgenen von NFκB innerhalb der Myelomzelle zählen die Cycline D1, D2 und D3, sowie c-Myc und CDK6.^{90–96} Das verstärkt transkribierte MDR-1 vermittelt der neoplastischen Zelle ihre Chemoresistenz. Indirekt entfaltet der Signalweg seine tumorprogressive Wirkung durch die Transkriptionsinitiation angiogener Faktoren (VEGF, MCP-1)⁹⁷, Adhäsionsmolekülen (VLA-4, VLA-5, ICAM)⁹⁸, Metalloproteinasen (MMP-1, MMP-9)^{99–101} und myelomspezifischen Wachstumsfaktoren (IL-6, MIP-α).¹⁰²

1.1.4 Die Myelomstammzelle

Untersuchungen verschiedener Tumorentitäten haben eine funktionelle Heterogenität der neoplastischen Zellen innerhalb eines Tumors aufgedeckt, obwohl die genetische Homogenität einen klaren Hinweis für den klonalen Ursprung dieses Tumors liefert. Die besondere, funktionelle Eigenschaft, über einen langen Zeitraum ungehindert zu proliferieren, kommt dabei nur einer Subpopulation der malignen Zellen zu.^{103–105} Sie werden als Tumorstammzellen bezeichnet und dessen Teilungsverhalten wird funktionell als Selbsterneuerung beschrieben. Die Tochterzellen differenzieren anschließend zur Gewebstumorzelle und bestimmen den Phänotyp des originären Tumors.^{106–111}

Auch bei Plasmazellneoplasien wurden diese Beobachtungen gemacht. Schon vor über 50 Jahren wurden am Beispiel eines murinen Plasmazelltumors funktionelle Unterschiede der malignen Zellen nachgewiesen. Das Potential zum klonalen Wachstum wies dabei nur eine begrenzte Anzahl an Tumorzellen auf.¹¹² Diese Beobachtungen wurden dann am humanen

Modell bestätigt und um die Information erweitert, dass diese Zellen zur Selbsterneuerung befähigt sind.^{113,114}

Das Multiple Myelom erwächst aus einer Plasmazelle, die das Keimzentrum durchlaufen und die somatische Hypermutation bereits abgeschlossen hat. Daher lässt sich die Klonalität verlässlich anhand der genetischen Homogenität ableiten.^{115–118} Aufbauend auf den Informationen vorhergehender Studien^{119–121} haben Matsui *et al.* den Phänotyp der Myelomstammzelle näher charakterisiert. Das Profil der Oberflächenmarker der zum klonalen Wachstum befähigten Myelomzellen wies starke Ähnlichkeiten zum Memory-B-Zell Phänotyp auf. Sie exprimierten CD45, CD19, CD20 sowie CD22. CD138-negative Zellen waren zur Koloniebildung befähigt, nicht jedoch die Zellen, welche diesen Oberflächenmarker exprimierten. Weiterhin waren die klonalen Zellen in der Lage, gereifte CD138-positive Tumorzellen zu generieren,¹²² die im etablierten Myelom die Mehrheit bilden und die phänotypische Gestaltung des Tumors übernehmen.¹²³

Genaktivitätsanalysen in Memory-B-Zellen zeigten, dass diese Zellen analog zur hämatopoetischen und embryonalen Stammzelle zur Selbsterneuerung befähigt sind.^{124,125}

Dieser Mechanismus scheint essentiell für die lebenslange Erhaltung der spezialisierten Memory-B-Zelle zu sein.^{126–129} Weitere Studien, die auf phänotypischen Ähnlichkeiten zwischen der zum klonalen Wachstum befähigten Tumorzelle und der Memory-B-Zelle aufbauen, stärken die Idee der Existenz einer klonalen Vorläuferzelle des Multiplen Myeloms. Auf der klonalen CD138-negativen Tumorzelle sind die Oberflächenmoleküle CD19 und CD27 co-exprimiert.¹³⁰ Beide Marker dienen bei Subpopulationsanalysen der Identifikation von Memory-B-Zellen.¹³¹ Demnach scheint die Stammzelle des Multiplen Myeloms nicht die reife Plasmazelle zu sein, sondern eine der Memory-B-Zelle sehr ähnliche Vorläuferzelle, aus der die differenzierten Tumorzellen hervorgehen.

Die Arzneimittelresistenz ist neben der Fähigkeit der Selbsterneuerung und der Generierung differenzierter Tochterzellen die dritte Eigenschaft, welche die Tumorstammzellen mit den adulten Stammzellen teilen.^{132–134} Darin wird die Hauptursache für die hohen Rezidivraten gesehen, welche das Multiple Myelom trotz innovativer Therapieansätze zu einer bisher unheilbaren Krankheit machen.^{130,135} Die Myelomstammzelle übernimmt damit die Funktion der Tumorinitiierung, Progression und des Erhalts der Neoplasie.

1.2 Interleukin-16

Interleukin-16 (IL-16) wurde 1982 als chemotaktischer Faktor von T-Lymphozyten entdeckt und wurde daher ursprünglich als *Lymphocyte Chemoattractant Factor* (LCF) bezeichnet.^{136,137} Trotz der ursprünglichen Nomenklatur ist IL-16 kein Chemokin, sondern ein Cytokin mit chemotaktischen Eigenschaften, da typische strukturelle Motive fehlen, die das Protein als Chemokin klassifizieren würden.¹³⁸ Strukturelle Homologien zu anderen Mitgliedern der Cytokine weist IL-16 dabei nicht auf. Seit seiner Entdeckung wurde IL-16 insbesondere im immunologischen Kontext detailliert analysiert und beschrieben. Ein Großteil der im Folgenden dargestellten Charakteristika von IL-16 basiert daher aus Erkenntnissen der T-Zellforschung.

1.2.1 Charakterisierung der Gen- und Proteinstruktur

Das humane IL-16 Gen ist auf dem Chromosom 15q26.3 lokalisiert und weist eine hoch konservierte Sequenz zu anderen Spezies auf, die auf eine starke funktionelle Homologie hindeutet.¹³⁹ Die Sequenzhomologie zu nicht humanen Primaten beträgt >95 % und zur Maus ca. 80%.^{140,141} Funktionelle Kreuzreaktivitäten des Proteins konnten für nicht humane Primaten, Maus, Ratte, Hund, Rind, Huhn und Blutegel aufgezeigt werden.¹⁴²⁻¹⁴⁷

Es gibt zwei Splicevarianten des humanen IL-16 Transkripts aus der ein 130 kDa Protein und ein 80 kDa Protein hervorgehen. Das 130 kDa schwere Protein kommt ausschließlich im zentralen Nervensystem vor und wird daher als neuronales IL-16 (NIL-16) bezeichnet. Die kleine Splicevariante wird vorrangig in immunassoziierten Geweben exprimiert und ist daher auch als hämatopoetisches IL-16 bekannt.^{141,143,148} Die Ausführungen und Untersuchungen der vorliegenden Arbeit werden sich auf die letztgenannte Form des IL-16 beziehen.

Der IL-16 Promotor hat keine TATA-Box, jedoch zwei CAAT-Box ähnliche Motive und drei potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktor GABP und dem co-Aktivator CREB-Bindungsprotein (CREBBP)/p300. Zwei dieser Bindungsmotive sind hochkonserviert und bereits als regulatorische Elemente der IL-2 und IL-18 Promotoren bekannt. Durch die Bindung von CREBBP/p300 an die α -Untereinheit von GABP wird eine Transkriptionsverstärkung verursacht.¹⁴⁹ Durch welchen Mechanismus eine Regulation der IL-16 Transkription ausgelöst wird, ist bisher nicht bekannt. Verschiedene Studien, welche die Abhängigkeit der IL-16 mRNA-Level vom Aktivierungszustand von T-Zellen eruierten, erzielten voneinander abweichende Ergebnisse. Beispielsweise zeigten Ren *et al.* eine aktivierungsbedingte Abnahme

der IL-16 mRNA in CD4⁺ T-Lymphozyten, die sie auf einen calcineurinabhängigen Mechanismus zurückführten.¹⁵⁰ Dahingegen erwies sich das durch Wu *et al.* untersuchte IL-16 mRNA Expressionsprofil von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten als aktivierungsunabhängig.¹⁵¹ Die generelle Halbwertszeit der IL-16 mRNA in Lymphozyten beträgt zwei Stunden.^{141,143}

Aus der 1.893 bp langen IL-16 mRNA geht das 80 kDa schwere Protein hervor, welches aus 631 Aminosäuren besteht. Es besitzt unterschiedliche konservierte Domänen, die auf eine rege Beteiligung des Moleküls an Proteininteraktionen schließen lassen. Dazu gehören ein PSD95 und ein Dlg1 Motiv, sowie drei PDZ Domänen und ein CcN Motiv. Letzteres umfasst ein Kernlokalisierungssignal (NLS, *nuclear leading sequence*), je eine Bindungsstelle für CK2 und CDC2 sowie ein SH3 Bindungsmotiv.¹⁵²

Dieses Protein wird als Vorläufermolekül bezeichnet, da es zur Entfaltung der biologischen Funktion prozessiert werden muss. Diese Spaltung erfolgt in T-Lymphozyten durch die aktivierte Caspase-3, wodurch ein ca. 60 kDa schweres N-terminales Fragment (NT-IL-16; 510 Aminosäuren) und ein ca. 20 kDa schweres C-terminales Fragment (CT-IL-16, IL-16, reifes IL-16; 121 Aminosäuren) entstehen. Letzteres wird von der Zelle als biologisch aktives Cytokin sekretiert.¹⁵³ In der Literatur herrscht keine Einheitlichkeit in der Benennung des Vorläuferproteins und seiner Spaltprodukte. Teilweise wird das Gesamtprotein als Pro-IL-16 bezeichnet, manchmal wird diese Benennung jedoch für das N-terminale Spaltprodukt verwendet. In der vorliegenden Arbeit meint der Ausdruck Pro-IL-16 stets das Vorläuferprotein.

Obwohl die aktivierte Caspase-3 als Komponente mit zentraler Bedeutung bei der Induktion des programmierten Zelltods involviert ist, ist die Spaltung von Pro-IL-16 nicht mit der Apoptose assoziiert.^{151,153} Dieser Prozessierungsmechanismus erinnert an die Spaltung von Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 durch die aktivierte Caspase-1, obwohl für IL-16 keine sequenzbasierten oder funktionellen Gemeinsamkeiten bekannt sind.¹⁵⁴ Anders als bei vielen anderen Proteinen, die als Vorläufermolekül exprimiert werden, übernehmen beide Spaltprodukte von Pro-IL-16 eine zelluläre Funktion. Da sich die Forschungsaktivitäten zur Charakterisierung von IL-16 in den ersten Dekaden nach dessen Entdeckung ausschließlich auf das extrazelluläre C-terminale Fragment beschränkten, wird das 20 kDa schwere Molekül als reifes bzw. biologisch aktives IL-16 bezeichnet. Mit der Identifikation der funktionellen Bedeutung des NT-IL-16 wurde erst ca. 20 Jahre später begonnen. Während das NT-IL-16 seine Funktion intrazellulär ausübt, wird das C-terminale Fragment als Cytokin sekretiert. Der

Sekretionsmechanismus ist bislang unbekannt. Da das C-terminale Fragment kein Signalpeptid trägt, wird ein vom endoplasmatischen Retikulum unabhängiger Sezernierungsverlauf vermutet.^{141,155} Wahrscheinlich kommt den 20 N-terminalen Aminosäuren des reifen IL-16 eine besondere Bedeutung zu, da Modifikationen dieser zu einer starken Reduktion der Sekretionskapazität führten.¹⁵⁶ Es wird postuliert, dass die Sekretion unter der Beteiligung von Chaperonen verläuft und dem Mechanismus der IL-1 β Sezernierung stark ähnelt.¹⁵⁷

IL-16 ist das erste extrazelluläre Protein, welches eine PDZ-Domäne aufweist. Aufgrund dessen wurde zunächst angenommen, dass das Cytokin erst nach der Bildung von Homotetrameren seine biologische Wirkung entfalten kann.¹⁵⁸ Diese These konnte später widerlegt werden. Zwar kommt es zu einer unspezifischen Ausbildung von Multimeren, für die Entfaltung der chemotaktischen Wirkung ist sie hingegen nicht erforderlich.¹⁵⁹ Weiterhin ist der biologische Effekt von IL-16 unabhängig vom Glykosylierungsstatus.^{158,159}

Das neuronale IL-16 besteht aus 1.322 Aminosäuren und trägt eine weitere PDZ-Domäne. Die 624 C-terminalen Aminosäuren sind identisch zu dem hämatopoetischen Pro-IL-16. Ebenso wie das Pro-IL-16 wird das NIL-16 durch die Caspase-3 prozessiert, woraus ein biologisch aktives Fragment mit einer Länge von 121 Aminosäuren hervorgeht.¹⁶⁰

1.2.2 Zelluläre Quellen und Zielmoleküle von Interleukin-16

Initial wurde eine starke Sekretion von IL-16 durch aktivierte CD8⁺-T-Lymphozyten beschrieben, welche das Migrationsverhalten von T-Lymphozyten maßgeblich anregt.^{161,162}

Mittlerweile ist bekannt, dass IL-16 durch eine Vielzahl unterschiedlicher Immunzellen und einiger anderen Zelltypen exprimiert und sekretiert wird. Die Expressionsstärke, Prozessierung und das Sekretionsverhalten sind dabei stark von der Zellart abhängig. Unstimulierte CD8⁺-T-Lymphozyten und Mastzellen zeigen eine konstitutive, aktivierungsunabhängige IL-16-mRNA-Expression und enthalten große Mengen an Pro-IL-16 sowie der prozessierten Form, die jedoch erst nach Zellaktivierung in den extrazellulären Raum entlassen wird.^{161–163}

Die Vorprozessierung und Speicherung des bioaktiven Cytokins ermöglicht eine sofortige Reaktion auf externe Stimuli. Die Aktivierung der CD8⁺-T-Lymphozyten wird durch Histamine, Serotonine, Antigene und Mitogene erreicht. Innerhalb von 1 – 4 h nach der Aktivierung findet die Sezernierung von IL-16 statt. Mastzellen werden durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder C5a zur IL-16-Sekretion angeregt.^{136,137,151,161,163,164} Die IL-16-Expression in

CD4⁺-T-Lymphozyten geschieht ebenfalls konstitutiv. Eine vorzeitige Prozessierung von IL-16 wird jedoch nicht vorgenommen. Diese wird erst nach dem Eingang von mitogenen oder antigenen Aktivierungssignalen induziert. Die Sekretion des bioaktiven IL-16 erfolgt innerhalb von 12 - 24 h.¹⁵¹ Dendritische Zellen, Eosinophile und Makrophagen werden durch GM-CSF und IL-4 zur Spaltung von Pro-IL-16 und Sezernierung des C-terminalen Fragments angeregt.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ Das IL-16 Expressionsprofil in B-Zellen ist bisher noch nicht abschließend aufgeklärt. Sharma *et al.* konnten eine konstitutive IL-16 mRNA-Expression in verschiedenen B-Zelllinien, sowie eine PMA-induzierte Sekretionsverstärkung von IL-16 nachweisen.¹⁶⁷ Primäre B-Zellen weisen ebenfalls eine konstitutive Genaktivität von IL-16 auf. Die latente IL-16-Sekretion dieser Zellen wird insbesondere durch Ionomycin, IFN- γ , IL-4 und anti-CD40 deutlich verstärkt.¹⁶⁸

IL-16 wird nicht nur in hämatologischen Zellen produziert und durch diese in den extrazellulären Raum entlassen. Ebenfalls sind die atemwegsassozierten Epithelzellen sowie Fibroblasten befähigt, bioaktives IL-16 zu sekretieren. Sowohl die Expression von Pro-IL-16 als auch dessen Spaltung werden durch TNF- α , TGF- β , IL-1 α und IL-1 β angeregt.¹⁶⁹⁻¹⁷²

Zum Zeitpunkt der Entdeckung von IL-16 waren CD4⁺-T-Lymphozyten die einzigen postulierten Zielzellen von löslichem IL-16. Seither konnte gezeigt werden, dass auch viele andere Zelltypen, beispielweise Eosinophile,¹⁷³ Mastzellen,¹⁷⁴ dendritische Zellen,¹⁶⁵ Monozyten,¹⁷⁵ T_{H1}-und T_{H2}-Zellen¹⁷⁶ sowie B-Lymphozyten¹⁷⁷ auf eine IL-16-Stimulation ansprechen. Die biologischen Effekte, die durch die intrazelluläre IL-16-Expression sowie die extrazelluläre Bindung an den Rezeptor hervorgerufen werden, sind dabei sehr vielseitig und ambivalent (siehe Kapitel 1.2.3).

Das Oberflächenmolekül CD4 gilt seit wenigen Jahren nach der Entdeckung von IL-16 als dessen primärer Rezeptor.^{175,178,179} Zum einen konnte dies über Funktionalitätsanalysen^{180,181}, und zum anderen über physikalische Assoziation¹⁵⁸ bestätigt werden. Als IL-16 Bindungsstelle wurde die D4-Domäne des CD4-Rezeptors identifiziert.¹⁷⁸ An der Interaktion ist die Aminosäuresequenz R¹⁰⁶RKS¹⁰⁹ des reifen IL-16¹⁸² und die Aminosäuresequenz W³⁴⁴QALLS³⁴⁹ des CD4-Moleküls¹⁷⁸ beteiligt. Die starke Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen Spezies ist nicht nur durch die Homologie der IL-16-Sequenz^{143,145,146} bedingt, sondern auch durch die hohe Konservierung der Sequenz der D4-Domäne, insbesondere der Interaktionsposition.¹⁵⁸ Bindungsaffinitätsanalysen deuten auf die Beteiligung des Chemokinrezeptors CCR5 als IL-16 co-Rezeptor hin.¹⁸³⁻¹⁸⁵

Die Bindung von IL-16 an den CD4-Rezeptor stimuliert die Aktivierung der Tyrosinkinase p56^{lck}.¹⁸⁰ Die IL-16-Signalweiterleitung geschieht dann in Abhängigkeit der SH2/SH3-Domänen von p56^{lck}, sie ist hingegen unabhängig von der SH1-Domäne.¹⁸⁶ Durch die Rekrutierung der Proteinkinase C wird die PI3-Kinase aktiviert sowie die IP₃ und Ca²⁺-Level erhöht.^{178,187} Über die aktive PI3-Kinase wird das Migrationsverhalten der Zellen gesteuert.¹⁸⁰ Die Signalkaskaden zur Induktion weiterer IL-16-spezifischer Effekte, wie die Sekretion inflammatorischer Moleküle, Induktion des Zellzyklusprogresses oder die Hochregulation der IL-2-Rezeptoruntereinheit α , sind bisher noch nicht ausreichend beschrieben, es existieren lediglich einige vage Vermutungen.^{186,188,189}

Das Oberflächenmolekül CD4 scheint jedoch nicht der einzige Rezeptor für IL-16 zu sein, da Zellen von CD4-Knock Out Mäuse ebenfalls in der Lage waren, auf IL-16 mit Migration und Sezernierung inflammatorischer Proteine zu reagieren, obwohl zugleich gezeigt wurde, dass bei Wildtypzellen eine Neutralisierung von IL-16 durch lösliches CD4 sowie eine Blockierung des CD4-Rezeptors durch einen monoklonalen Antikörper den Effekt von IL-16 hemmt.¹⁹⁰ Auch in CD4-negativen Langerhanszellen (unreife, epidermale dendritische Zellen) konnte eine IL-16-abhängige Migration induziert werden.¹⁹¹ Eine postulierte Alternative zu CD4 ist der Tetraspaninrezeptor CD9. Es wurde eine funktionelle Relevanz von CD9 für die Induktion IL-16-spezifischer Effekte nachgewiesen.¹⁷⁴ Die Beteiligung noch weiterer Rezeptoren ist denkbar, muss jedoch noch erforscht werden.

1.2.3 Pleiotrope Funktion von Interleukin-16

- Neuronales IL-16

Die Funktion des NIL-16 ist bislang nicht eindeutig beschrieben. Einige Untersuchungen deuten auf eine Beteiligung als Gerüstprotein für neuronale Ionenkanäle hin. Möglicherweise nutzt es dabei seine zahlreichen PDZ-Domänen, um mit weiteren Proteinen zu interagieren. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die sekretierte Form von IL-16 einen aktivierenden Effekt auf neuronale Zellen hat.¹⁶⁰ In zerebellären Neuronen findet nach der Stimulierung mit reifem IL-16 eine Induktion von c-Fos statt, die mit einer erhöhten Wachstums-, Teilungs- und Überlebensrate einhergeht.¹⁹² Die NIL-16-Expression ist in Mikrogliazellen einer inflammatorischen Gehirnverletzung erhöht^{193,194} und fördert in der sekretierten Form das Migrationsverhalten von T-Lymphozyten.¹⁴²

- Nukleäres NT-IL-16

Nach der Spaltung von Pro-IL-16 transloziert das NT-IL-16 in den Zellkern, um einen inhibierenden Effekt auf den Zellzyklusprogress auszuüben.^{159,195,196} In ruhenden T-Zellen agiert das nukleäre NT-IL-16 als Gerüstprotein für die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren und co-Aktivatoren. GABP β 1 und HSC70 interagieren dabei mit der PDZ-Domäne 1, während die Myosinphosphatase und HDAC3 an die PDZ-Domäne 2 binden. Dieser Komplex ist an den Transkriptionsfaktor GABP α assoziiert und inhibiert dadurch die Transkription von Skp2. Skp2 ist ein Repressor der Zellzykluskontrolle. Dessen Expression mündet in der Zellzyklusprogression. Die Proteinlevel von Skp2 und dem anti-proliferativen Protein p27^{KIP1} sind negativ korreliert. Eine Unterdrückung der Skp2-Expression durch die nukleäre Translokation von IL-16 führt dadurch zum p27^{KIP1}-vermittelten G₀/G₁-Zellzyklusarrest.^{197–200}

- Sekretiertes IL-16

Das nach Spaltung von Pro-IL-16 sezernierte C-terminale IL-16 wirkt chemotaktisch auf sämtliche periphere Immunzellen, die das Oberflächenmolekül CD4 exprimieren, u. a. CD4⁺-T-Lymphozyten,¹⁷⁶ Monozyten,¹⁷⁵ Eosinophile,¹⁷³ und dendritische Zellen¹⁶⁵. Bei Lymphozyten konnte neben der chemotaktischen Wirkung auch ein Effekt auf die Aktivierung der Chemokinese aufgezeigt werden. Im Gegensatz zu den meisten Chemokinen, erfolgt die durch IL-16 stimulierte Induktion der Chemotaxis und der Chemokinese unabhängig von einer vorhergehenden Zellaktivierung.^{158,175,181,201}

Nach der Stimulierung mit IL-16 ist der Aktivierungsmarker HLA-DR auf den T-Lymphozyten nachweisbar und indiziert somit den zellaktivierenden Effekt von IL-16.¹⁷⁵ Das Cytokin verstärkt das Wachstum von T-Lymphozyten und Monozyten, indem es den Wiedereintritt in den Zellzyklus fördert und gleichzeitig die Expression der IL-2-Rezeptoruntereinheit α (IL-2R α) erhöht. Somit verstärkt IL-16 die Funktion des IL-2-Rezeptors (IL-2R), dem wichtigsten Wachstumsfaktorrezeptor der T-Lymphozyten.^{175,188,202,203}

Der proliferationsfördernde Effekt wird durch die simultane Stimulierung mit IL-2 und IL-15 deutlich gesteigert.^{188,204} IL-16 stimuliert außerdem die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine durch seine Zielzellen. Auf eine Stimulierung mit bioaktivem IL-16 reagieren Monozyten beispielsweise mit der Sekretion von IL-6, TNF- α , IL-1 β und IL-15.²⁰⁵

Die aktivierende Wirkung von IL-16 auf die Ausbildung einer Immunantwort wird weiterhin dadurch verstärkt, dass es bei Makrophagen eine Erhöhung der Expression von HLA-DR herbeiführt, was eine intensivere Antigenpräsentation zur Folge hat.¹⁷⁵ Außerdem wird die Anzahl der Adhäsionsmoleküle von Eosinophilen positiv durch IL-16 beeinflusst sowie die Bildung von Leukotrien C4 und IL-4 angeregt.^{206,207}

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften gilt IL-16 als Immunmodulator und Zellaktivator. Dem Cytokin wird jedoch ebenfalls eine immunsuppressive Wirkung zugesprochen, denn neben den aktivierenden Zellen einer Immunantwort, speziell den T_{H1}-Zellen, rekrutiert IL-16 präferentiell regulatorische T-Zellen und ist damit in der Lage, auch die Ausbildung einer Immunantwort zu hemmen. Neben der chemotaktischen Wirkung auf die regulatorischen Zellen, induziert IL-16 eine Expressionsverstärkung des regulatorischen Transkriptionsfaktors FoxP3.²⁰⁸ Weitere Studien belegen, dass IL-16 die T-Zellstimulierung in einer gemischten Lymphozytenkultur inhibiert, weil es die Aktivierung des T-Zellrezeptor/CD3-Komplexes stört.²⁰⁹ Das Ausbleiben einer T-Zellrezeptor/CD3-vermittelten Signalkaskade führt zur reduzierten Induktion der IL-2R α -Neusynthese und zur Hemmung der IL-2-Produktion. Somit übt IL-16 auf weiterer Ebene eine immunsuppressive Funktion aus.^{210,211}

Auch ein geringer Anteil von B-Lymphozyten exprimiert das Oberflächenmolekül CD4²¹² und sind somit in der Lage, auf IL-16 zu reagieren. Lymphoblastoide B-Zelllinien sind bekannt für ihre CD4-Oberflächenexpression und eine Reaktivität auf IL-16 konnte bei der CD4⁺-Subpopulation dieser Zellen beobachtet werden.²¹³ Die funktionelle Bedeutung von IL-16 bei B-Zellen wurde bisher noch nicht hinreichend erforscht, es gibt jedoch erste Hinweise. Murine Daten deuten darauf hin, dass das Cytokin die Differenzierung von pro-B-Zellen zu prä-B-Zellen anregt. Es konnte eine Aktivierung der RAG-1- und RAG-2-Genexpression nachgewiesen werden, die an eine VDJ-Rekombination der schweren Immunglobulinkette geknüpft ist, die einen weiteren Differenzierungsschritt in der B-Zellreifung darstellt. Darüber hinaus wurde eine IL-16 stimulierte pre-B-Zellexpansion in Nacktmäusen beobachtet.¹⁷⁷ Die Forschungsergebnisse von Kaser *et al.* im humanen Modell deuten darauf hin, dass das von den B-Lymphozyten sekretierte IL-16 die Zellkommunikation zwischen B-Zellen, T-Zellen und dendritischen Zellen im Lymphfollikel vermittelt und intensiviert.^{165,168} Auch die Interaktionszone von T- und B-Lymphozyten in den Mandeln zeigt eine hohe Präsenz an IL-16, wodurch die Hypothese, IL-16 steuere Zellkommunikation, untermauert werden. Diesmal

schiene die T-Lymphozyten die Hauptquelle des Cytokins zu sein, dessen Sekretion zur Differenzierung der B-Zellen führte.²¹⁴

1.3 Interleukin-16 im pathologischen Kontext

1.3.1 Interleukin-16 bei inflammatorischen Erkrankungen

IL-16 kann in verschiedensten organspezifischen Sekreten im Verlauf eines inflammatorischen Prozesses nachgewiesen werden. Als starker Mediator von Immunreaktionen trägt das Cytokin auch zur Herausbildung zahlreicher inflammatorischer Erkrankungen und Autoimmunreaktionen bei.

Bei der atopischen Dermatitis ist IL-16 maßgeblich an der akuten und der chronischen Phase beteiligt. Die akute Phase zeichnet sich durch eine zehnfach verstärkte Rekrutierung von CD4⁺-T-Lymphozyten aus, die von der Präsenz IL-16-positiver Zellen abhängt.^{171,215} Anhand von Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die pathologische, hypersensitive Immunreaktion durch IL-16 hervorgerufen wird. Eine Blockierung des löslichen IL-16 mit monoklonalen Antikörpern konnte bei allen Versuchen die T-Zellrekrutierung und die unregulierte Inflammation vermeiden.^{215,216} Viele weitere entzündungsbedingte Hauterkrankungen sind auf den modulativen Effekt von IL-16 zurückzuführen. Beispielsweise zählen das pädiatrische Ekzem/Dermatitis Syndrom²¹⁷ und die Kopfhauterkrankung Alopecia Areata²¹⁸ dazu.

Weiterhin sind chronische entzündliche Darmerkrankungen auf den inflammatorischen Effekt von IL-16 zurückzuführen. Der Morbus Crohn ist durch dreifach erhöhte IL-16 Proteinlevel gekennzeichnet und geht mit einem starken Influx von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten ins Darmepithel einher.²¹⁹⁻²²¹ Die Anzahl der IL-16-positiven Zellen korreliert mit der Intensität der T-Zellinfiltration. Als Hauptquelle des IL-16 konnten Eosinophile identifiziert werden.²²² Es wird vermutet, dass ein detektierter Einzelnukleotidpolymorphismus (*SNP, single nucleotide polymorphism*) im IL-16-Gen für die erhöhte mRNA-Expression verantwortlich ist.²²³

Eine Assoziation von IL-16 an die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen konnte bisher für die rheumatoide Arthritis (RA), dem Morbus Basedow (GD, *graves disease*), dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) und der multiplen Sklerose (MS) beschrieben werden. Bezeichnend für die RA ist ein massiver Influx von Immunzellen in die Gelenkflüssigkeiten, welche eine autoimmune Inflammation hervorrufen. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen weist die Gelenkflüssigkeit von RA Patienten stark erhöhte IL-16 Level auf. Es konnte gezeigt

werden, dass die synovialen Fibroblasten in hohem Maße bioaktives IL-16 sekretieren und somit CD4⁺-T-Lymphozyten anlocken.^{172,224–226} Fibroblasten der GD Patienten produzieren ebenfalls verstärkt IL-16. In diesem Kontext agiert es synergistisch mit RANTES und erhöht somit deutlich die Infiltration von CD4⁺-T-Lymphozyten in Schilddrüse, Augenmuskel und Subkutangewebe.^{183,184,227} Der mechanistische Beitrag von IL-16 für die Progression des SLE wurde bisher noch nicht bestimmt. In verschiedenen Studien wurde jedoch gezeigt, dass steigende IL-16-Proteinlevel bei SLE Patienten mit dem Schweregrad der Krankheit korreliert sind.^{228–230}

Bei MS-Patienten wird die autoimmune Inflammationsreaktion von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten sowie von Makrophagen dominiert.^{231–234} Auch die Progression dieser Autoimmunkrankheit ist an erhöhte IL-16 Proteinlevel geknüpft. Als mögliche Quelle werden cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) angesehen, die spezifisch für das Myelinproteolipidprotein (PLP) sind. Auf die Stimulierung mit PLP reagieren diese CTLs mit einer starken IL-16-Sekretion.²³⁵ In dem Tiermodell von MS, der experimentellen autoimmunen Encephalitis (EAE) wurde die Korrelation der IL-16-Level mit der Anzahl der infiltrierenden CD4⁺-T-Lymphozyten ins zentrale Nervensystem aufgezeigt. Die Neutralisierung des bioaktiven IL-16 führte zu einer 75 %igen Reduktion der CD4⁺-T-Zellen in diesem Kompartiment. Ebenfalls konnten durch diese Behandlung die eingangs aufgetretenen Lähmungserscheinungen unterbunden werden.²³⁶

1.3.2 Interleukin-16 bei malignen Erkrankungen

In den vergangenen Jahren wurde immer häufiger über einen Zusammenhang von IL-16 und malignen Erkrankungen berichtet. Die meisten Studien belegten eine erhöhte IL-16-Konzentration im Serum von Tumorpatienten. Daher wird das Interesse an der Erforschung von IL-16 im onkologischen Kontext zunehmend größer. Die positive Korrelation der IL-16 Konzentration mit der Aggressivität des Tumors konnte sowohl in soliden, als auch in hämatologischen Tumoren beobachtet werden. Jedoch gibt es bisher kaum Daten, welche den Beitrag von IL-16 in der Tumorgenese erklären.

- Solide Tumoren

Mammakarzinome weisen eine erhöhte IL-16-Expression auf, die auf eine posttranskriptionelle Deregulation in den malignen Zellen begründet liegt. Das RNA-bindende Zinkfingerprotein Tristetraprolin vermittelt in nicht-transformierten Zellen die Degradation der mRNA verschiedenster pro-inflammatorischer Cytokine und wachstumsfördernder Proteine.²³⁷

Der Verlust von Tristetraprolin durch die verstärkte Expression von miR29 führt zur unkontrollierten Produktion und Sekretion von IL-16 durch die neoplastischen Zellen des Mammakarzinoms. Durch den Anstieg der IL-16-Level im extrazellulären Raum werden direkt Makrophagen rekrutiert und eine tumorunterstützende Mikroumgebung generiert.^{238,239}

Auch die Progression des Ovarialkarzinoms scheint an die IL-16 Überexpression in den neoplastischen Zellen geknüpft zu sein. In dieser Tumorentität konnte ein Zusammenhang zwischen der IL-16-Sekretion und der tumorassoziierten Angiogenese gezeigt werden. Die Ursache für die IL-16-Expression ist zunächst noch unbekannt.²⁴⁰ Weiterhin stehen IL-16-Überexpressionen in engem Zusammenhang zu einem herausgebildeten Lungentumor. Plasma und Pleuraergüsse von Lungenkrebspatienten sind durch stark erhöhte IL-16-Level charakterisiert, die im nicht-malignen Kontext nicht nachweisbar sind.²⁴¹ Mechanistische Erklärungen und die Bedeutung von IL-16 in dieser Neoplasie sind noch unbestimmt.

Genotypisierungen sind Standardmethoden zur Identifikation genetischer Prädispositionen sämtlicher Tumorentitäten. Auf diese Weise wurden drei verschiedene SNPs auf dem IL-16-Genlokus detektiert, die signifikant an ein erhöhtes Risiko geknüpft sind, ein Prostatakarzinom zu entwickeln.²⁴² Weiterhin wurde eine strenge Korrelation der IL-16-Expression im Tumorgewebe des Prostatakarzinoms und der Aggressivität der Krankheit aufgezeigt. Zudem entwickeln Tumore mit intensiver IL-16-Expression nach Behandlung schneller ein Rezidiv.²⁴³ Erhöhte Serumlevel von IL-16, insbesondere im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit, wurden ebenfalls bei Renaltumoren und Gastrointestinalkarzinomen entdeckt. Auch diese Tumorentitäten zeigen SNPs, die mit einem höheren Erkrankungsrisiko einhergehen.²⁴⁴ Zu den gleichen Erkenntnissen kam eine Genanalyse von einer Kohorte von Nasopharynx-Karzinomen. Es wurde ein SNP des IL-16-Gens identifiziert, welcher mit einem signifikanten Erkrankungsrisiko einhergeht.²⁴⁵ Ein Zusammenhang zu den IL-16-Konzentrationen im Serum oder in der Tumorumgebung wurden bisher noch nicht angestellt.

- HämATOlogische Tumoren

Kleine vereinzelte Studien lassen darauf schließen, dass erhöhte IL-16-Level ebenfalls charakteristisch für fortgeschrittene hämatologische Erkrankungen sind. Eine umfassende Validierung der Hypothese steht noch aus.

In einer krankheitsübergreifenden Studie wurde die Abhängigkeit der IL-16-Serumlevel vom Krankheitsverlauf sowie die Korrelation mit bekannten prognostischen Faktoren eruiert. Mit Ausnahme des folliculären Lymphoms konnten in allen anderen untersuchten lymphatischen Neoplasien ein positiver Zusammenhang zwischen der IL-16-Proteinkonzentration und der Krankheitsprogression dargestellt werden. Zu den untersuchten Tumorentitäten gehörten die chronische lymphatische Leukämie und deren Unterform das kleinzellige B-Zelllymphom sowie das Mantelzelllymphom und das Multiple Myelom.²⁴⁶ Aus dem Burkitt-Lymphom und dem Non-Burkitt-Lymphom etablierte Zelllinien zeigten ebenfalls eine starke IL-16-Expression.¹⁶⁷ Bisher gibt es keine mechanistischen Erklärungen für die beobachteten Zusammenhänge.

Der progressive Einfluss von IL-16 auf die Pathogenese der cutanen T-Zell-Lymphome (CTCL, *cutaneous T cell lymphomas*) konnte dahingegen schon ansatzweise aufgeklärt werden. Die Gruppe der CTCLs umfasst verschiedene T-Zell-Non-Hodgkin Lymphome, die mit der Erkrankung der Haut assoziiert sind. Bisher konnten mehrere Wachstumsfaktoren identifiziert werden, welche die Herausbildung der Neoplasie maßgeblich beeinflussen. Neben IL-16 zählen auch IL-2, IL-7, IL-15 und IL-18 zu den CTCL Mitogenen.²⁴⁷⁻²⁵³ Im Fall des Sezary Syndroms, einer der häufigsten CTCLs wurde ein Verlust von nukleären NT-IL-16 beobachtet, der durch eine deutliche Erhöhung der IL-16 Sekretion begleitet war. Beide Ereignisse waren mit einem voranschreitenden Krankheitsverlauf verbunden, sodass eine Eignung von IL-16 als prognostischer Marker empfohlen wurde.²⁰⁴ Beide Spaltprodukte von Pro-IL-16 scheinen demnach an der Pathogenese von CTCLs beteiligt zu sein. Eine Ursachenerforschung des nukleären Verlustes von NT-IL-16 identifizierte eine Sequenzmutation in der PDZ-Domäne 1, welche die Interaktion von NT-IL-16 mit den Chaperonen und HSC70 verhindert. Aufgrund dessen erfolgt die Expression von Skp2, was seinerseits den Zellzyklusprogress fördert.²⁵⁴ Zwar kann der funktionelle Verlust von NT-IL-16 durch die Mutation der PDZ-Domäne 1 erklärt werden, nicht aber die fehlende nukleäre Lokalisation. Vermutlich wird NT-IL-16 nach dessen Transport in den Zellkern nur dann dort verweilen, wenn es mit den anderen kernassoziierten Proteinen interagiert.

Erhöhte Serumlevel des reifen IL-16 verstärken die angeregte Proliferation der malignen Zellen weiter. Die intensive Sekretion des Mitogens ist vermutlich auf eine konstitutiv aktivierte Caspase-3 in den malignen Zellen zurückzuführen.²⁰⁴ Nicht-maligne T-Zellen sind nicht sehr sensitiv gegenüber einer isolierten IL-16-Stimulierung.¹⁸⁸ Jenes gilt hingegen nicht für immortalisierte T-Zellen.²⁰³ Im Wirtsorganismus der CTLCs wird der proliferative Effekt von IL-16 zusätzlich durch erhöhte IL-15-Level unterstützt.^{204,253}

Ob IL-16 eine Bedeutung bei der Pathogenese des Multiplen Myelom zukommt und welchen konkreten Einfluss das Cytokin dabei ausüben könnte, ist bislang nicht erforscht worden. Einige Korrelationsstudien deuten jedenfalls auf einen Beitrag von IL-16 an der Krankheitsprogression hin. In einer Studie von Alexandrakis *et al.* verhielten sich die IL-16 Serumkonzentrationen ähnlich, wie der wichtige Wachstumsfaktor der Myelomzellen und etablierte prognostischen Marker IL-6. Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf zeigten deutlich höhere IL-16 und IL-6 Level im Serum des peripheren Bluts, als Patienten aus frühen Krankheitsstadien oder gesunde Spender. Nach einer chemotherapeutischen Behandlung der Patienten wurde eine Reduktion der Cytokinkonzentrationen im Serum beobachtet. Weiterhin korrelierte die IL-16-Serumkonzentration mit einer schlechteren Überlebensrate der Myelompatienten.²⁵⁵ Diese Datenerhebung wurde allerdings als retrospektive Untersuchung mit einem kleinen Patientenkollektiv durchgeführt und gilt daher als vorläufig. Die positive Korrelation der IL-16-Serumlevel mit der Krankheitsprogression wurde in zwei weiteren Studien mit limitierten Stichprobenumfang bestätigt.^{6,256} Eine weitere Fallstudie berichtet über einen nochmaligen Anstieg der IL-16-Serumkonzentration bei einem bereits streuenden Phänotyp des Multiplen Myeloms. Die Streuung der neoplastischen Plasmazelle findet nur sehr selten statt und ist mit einer sehr hohen Tumorlast assoziiert.^{257,258} Der Patient mit den stark erhöhten IL-16-Level ist kaum empfänglich für die Chemotherapie. Auf die initiale Rückbildung des Tumors folgte eine rapide Streuung der malignen Zellen.²⁵⁹ Die Quelle der erhöhten IL-16-Level scheinen die malignen Plasmazellen selbst zu sein, da die IL-16-Konzentration im Knochenmarksplasma mit der Anzahl der infiltrierten Plasmazellen korreliert.²⁶⁰ Bei nicht transformierten B-Lymphozyten konnte die Fähigkeit der IL-16-Sekretion nachgewiesen werden, allerdings im weitaus geringeren Maße.^{167,168} Auch ein progressiver Effekt auf die Expansion der pre-B-Zellen konnte gezeigt werden,¹⁷⁷ der sich möglicherweise auf den onkologischen Sachverhalt erweitern ließe. Auf welche Weise IL-16 tatsächlich zur Progression der Krankheit beiträgt, oder ob das Cytokin lediglich als

Nebenerscheinung der Plasmazellproliferation auftritt, jedoch für die Pathogenese bedeutungslos ist, muss noch aufgeklärt werden.

Eine weitere Assoziation von IL-16 mit dem Multiplen Myelom basiert auf der Beobachtung von phänotypischen Veränderungen der T-Lymphozytenpopulation sowie deren Expression des Aktivierungsmarkers HLA-DR. Koike *et al.* berichten, dass Patienten, die hohe Level an IL-16-Serumprotein aufwiesen, mit einem fortgeschrittenen Krankheitsverlauf assoziiert sind, der außerdem durch eine absolute und relative Reduktion der CD4⁺-T-Lymphozyten sowie eine leichte Erhöhung der CD8⁺-T-Zellen gekennzeichnet war.⁶ Bioaktives IL-16 ist bekannt dafür, eine Expressionsverstärkung von HLA-DR zu induzieren,¹⁷⁵ und eine Überexpression von HLA-DR, insbesondere auf CD8⁺-T-Lymphozyten ist eng an die Aktivität des Multiplen Myeloms gekoppelt.²⁶¹⁻²⁶³ Worin die phänotypischen Veränderungen begründet liegen und ob ein kausaler Zusammenhang zwischen IL-16, der Tumorlast und dem verringerten CD4⁺/CD8⁺-T-Zellverhältnis besteht, bleibt zu eruieren.

Die Ausführungen über die Korrelation von IL-16 mit einer aggressiven Tumorgenese lassen viele Spekulationen über die Mitwirkung des Cytokins bei der Progression unterschiedlichster Tumorentitäten zu, fundierte experimentelle Validierungen wurden jedoch bisher nicht vorgenommen. Insbesondere beim Multiplen Myelom eröffnet sich durch die Hinweise der Vorstudien ein komplett neues Forschungsfeld mit vielen offenen Fragestellungen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze und die standardisierte Durchführung der autologen Stammzelltherapie zur Bekämpfung des Multiplen Myeloms haben die Überlebensraten und die Lebensqualität der Myelompatienten in den letzten Jahren maßgeblich verbessert. Jedoch gilt diese hämatologische Tumorerkrankung noch immer als unheilbar und wird durch eine hohe Rückfallrate sowie ein stark reduziertes Gesamtüberleben charakterisiert. Daher besteht weiterhin die dringende Notwendigkeit, die Tumorbilogie des Multiplen Myeloms detaillierter und differenzierter zu charakterisieren, um neue therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren, die effektiv zur Eliminierung der Neoplasie beitragen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das Cytokin IL-16 im Kontext des Multiplen Myeloms zu charakterisieren und dessen Potential als zukünftige therapeutische Zielstruktur zu validieren. Bisher ist IL-16 als modulatorischer Faktor der Herausbildung der adaptiven Immunantwort in gesunden Individuen und chronisch inflammatorischen Erkrankungen bekannt. Im ersten Teil der Arbeit sollten Expressionsanalysen auf Transkript- und Proteinebene Aufschluss geben, ob Myelomzellen in der Lage sind IL-16 zu produzieren und ob es Regulationsmechanismen gibt, welche die IL-16-Expression steuern. Da IL-16 vor der Entfaltung seiner biologischen Aktivität prozessiert und der carboxyterminale Teil des Spaltprodukts sekretiert werden muss, sollte das IL-16-Sezernierungsverhalten der Myelomzellen charakterisiert und potentiell verantwortliche Proteasen identifiziert werden.

Ziel des zweiten Abschnitts war die Identifizierung biologischer Prozesse, die im Multiplen Myelom durch IL-16 beeinflusst werden und den malignen Zellen möglicherweise selektive Vorteile verschaffen, die zur Krankheitsprogression beitragen. Dafür sollten zunächst stabil transduzierte Myelomzelllinien etabliert werden, in denen ein stabiler IL-16-Knockdown induziert werden kann. Basierend auf genomweiten Expressionsanalysen IL-16-positiver und artifiziell IL-16-negativer Myelomzelllinien sollten Hinweise auf die mögliche funktionelle Bedeutung von IL-16 in dieser Tumorentität abgeleitet werden.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte der Frage nach der funktionellen Bedeutung von IL-16 auf die Tumorbilogie der neoplastischen Plasmazellen detaillierter nachgegangen werden. Ziel war es, einige der im zweiten Abschnitt postulierten Effekte durch funktionelle Analysen zu verifizieren. Insbesondere sollte der Beitrag von IL-16 auf das proliferative Verhalten der Tumorstammzellen sowie der Gewebstumorzellen untersucht werden. Außerdem sollte der Einfluss von IL-16 auf die Vitalität und das Zellsterben analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemein benötigte Geräte

Name	Firma
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent
Axiovert 40	Zeiss
Axio Scope A.1 (HXP 120C Fluoreszenzlampe)	Zeiss
Beta Counter, 1450 Microbeta	PerkinElmer
Elektrophoresesystem Novex Mini-Cell	Invitrogen
ELISA-Reader (Sunrise-Basic®)	Tecan
ELISPOT Reader	AID Diagnostika
FACS LSR Fortessa	BD Bioscience
Flüssigkeitsszintillationszähler (1450 MicroBeta Wallac Trilux®)	PerkinElmer
Gefrierschrank -80 °C	Liebherr
Geldokumentationssystem (Transilluminator)	Peqlab Biotech
Gelelektrophoresekammer (DNA Sub Cell)	Bio-Rad
Gelelektrophorese-Stromquelle (PowerPac300)	Bio-Rad
Gelkämme 15er	Bio-Rad
Gelschlitten	Bio-Rad
Improvision Spinning Disc confocal microscope	PerkinElmer
Innova 40 Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific
Kühlschrank mit Gefrierfach	Liebherr
Heißsiegelmaschine (1295-012 Heat Sealer®)	LKB Wallac
Leica TCS SP5 II	Leica Microsystems
Lightcycler 96®	Roche
MicroBeta FilterMate-96 Harvester	PerkinElmer
Multikanalpipette 0,5-10 µl	Eppendorf
Multikanalpipette 30-300 µl	Eppendorf
Multi-Step-Pipette (Multipipette®)	Eppendorf
Neubauer Zählkammer	Carl Roth
Spektrophotometer (NanoDrop ND-1000®)	Peqlab Biotech
pH-Meter	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten
Pipette 0,5-10 µl	Eppendorf
Pipette 2-20 µl	Eppendorf
Pipette 10-100 µl	Eppendorf
Pipette 20-200 µl	Eppendorf
Pipette 100-1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe (Pipetus®)	Hirschmann Laborgeräte
Röntgenfilmentwicklungsmaschine Curix 60	Agfa Healthcare
Röntgenkassette	Rego
Sterilwerkbank	Heraeus
Thermocycler (Mastercycler gradient®)	Eppendorf

Vortex-Mixer (Genie 2®)	Bender und Hobein
Waage	Ohaus
Wasserbad	GFL
Zentrifuge (Centrifuge 5404R®)	Eppendorf
Zentrifuge (Centrifuge 5415R®)	Eppendorf

2.1.2 Allgemein benötigte Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
10 cm Zellkulturschalen	Greiner Bio-one
6 cm Zellkulturschalen	Greiner Bio-one
6-Well Platte	Greiner Bio-one
12-Well Platte	Greiner Bio-one
24-Well Platte	Greiner Bio-one
96-Well Platte (Flachboden)	Greiner Bio-one
96-Well Platte (Rundboden)	Costar
Eppendorf Safe-Lock Tube®(1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf
FACScan Röhrchen (5 ml Rundboden)	Sarstedt
Falcon Tube (15ml; 50 ml)	Greiner Bio-one
Handschuhe Latex	Supermax
Kryo Tubes	Nunc Thermo Scientific
Parafilm	Bemis
PCR Soft Tube 0,5 ml	Biozym
PCR-Tube 8er Kette + Deckel (Multiply®-µStrip)	Sarstedt
Pipettenspitzen 0,5-10 µl (gestopft)	Sarstedt
Pipettenspitzen 2-20 µl (gestopft)	Sarstedt
Pipettenspitzen 10-100 µl (gestopft)	Sarstedt
Pipettenspitzen 2-200 µl (gestopft)	Sarstedt
Pipettenspitzen 100-1000 µl (gestopft)	Sarstedt
Pipettenspitzen (Multi-Step-Pipette) 0,1 -10 mL	Eppendorf
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Becton Dickinson
Sterilfilter (0,22; 0,45)	Millex
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Sarstedt

2.1.3 Allgemein benötigte Reagenzien

Name	Firma
Aceton	Merck
Antifect®N liquid	Schülke und Meyer
DEPC behandeltes nukleasefreies Wasser (steril)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck
Isopropanol	Merck
Methanol	Merck
PBS (steril)	Life Technologies

2.1.4 Reagenzien für zellbiologische Methoden

2.1.4.1 Kultivierung von Zellen

Name	Firma
Aqua stabil	
Blasticidine S Hydrochloride	Sigma-Aldrich
DMEM GlutaMAX™ Zellkulturmedium	Life Technologies
DMSO	Sigma-Aldrich
Doxycyclin Hyclate	Sigma-Aldrich
DPBS	Life Technologies
Ficoll	Biochrom AG
IMDM GlutaMAX™ Zellkulturmedium	Life Technologies
Interleukin-2	Roche
FCS (hitzeinaktiviert)	Life Technologies
Penicillin/Streptavidin	Life Technologies
PHA (Phytohaemagglutamin)	Sigma-Aldrich
Puromycin Dichloride	Sigma-Aldrich
RPMI 1640-GlutaMAX™ Zellkulturmedium	Life Technologies
Trypan Blue 0,4 %	Life Technologies
Trypsin-EDTA Phenolred (0,05 %)	Life Technologies

Puffer	Firma
Einfriermedium (in FCS)	
10 % DMSO	Sigma-Aldrich
Erylysepuffer (in Wasser), pH 7,4	
155 mM NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich
1 mM KHCO ₃	Merck
0,1 mM EDTA	Sigma-Aldrich

Zelllinien	Art
AMO-1	Plasmazytom
EJM	Multiples Myelom
IM-9	B-Zell Lymphoblast
HEK293T	transformierte embryonale Nierenzelle
KMS-12-BM	Multiples Myelom
LP-1	Multiples Myelom
MOPLP-8	Multiples Myelom
NCI-H292	Multiples Myelom
RPMI-8226	Multiples Myelom
SK-007	Multiples Myelom
U-266	Multiples Myelom

2.1.4.2 Proliferationsassay

Name	Firma
3H-Thymidin (55,5 MBq in 1500 µl)	Hartmann Analytic
Bedruckte Filtermatten	PerkinElmer
Einschweißhüllen für Filtermatten	PerkinElmer
Kassetten für Filtermatten	PerkinElmer
Szintillationsflüssigkeit Betaplate Scint	PerkinElmer

2.1.4.3 Viabilitätsassay

Name	Firma
MTT-Reagenz	ATCC
Detergenzpuffer	ATCC

2.1.4.4 Colony Formation Assay

Name	Firma
Methocult™ Classic	Stem Cell Technologies

2.1.4.5 Herstellung und Anwendung lentiviraler Vektoren

Name	Firma
Calciumchlorid Dihydrate	Sigma-Aldrich
Chloroquine Diphosphat	Sigma-Aldrich
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	ICN Biomedicals
HEPES (1M)	Life Technologies
Polybren	Sigma-Aldrich

Puffer	Firma
2 x HBS (in Wasser), pH 7,05	
42 mM HEPES	ICN Biomedicals
280 mM NaCl	Carl Roth
10 mM KCl ₂	Carl Roth
1,5 mM Na ₂ HPO ₄	Merck
11 mM Glukose	Roth

Plasmide	Firma
Expressionsvektoren	
pLenti6.4 IL-16 Prom_TurboGFP_dest1	interne Herstellung (siehe 2.3.8.12)
pLenti6.4 IL-16 Prom_TurboGFP_dest2	interne Herstellung (siehe 2.3.8.12)
pLenti6.4 IL-16 Prom_TurboGFP_dest3	interne Herstellung (siehe 2.3.8.12)
TRIPZ shRNA1	Open Biosystem
TRIPZ shRNA2	Open Biosystem
TRIPZ shRNA3	Open Biosystem
TRIPZ shRNA4	Open Biosystem
TRIPZ Negativkontrolle	Open Biosystem
Verpackungsplasmide	
phCMV-VSG-G	Zur Verfügung gestellt von Dr. Kristoffer Rieken, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
pMDLg/pRRE	
pRSV-Rev	

Vektor	shRNAmir Sequenzen (<i>sense-Strang</i> , <i>Loop</i> , <i>anti-sense-Strang</i>)
TRIPZ shRNA1	TGCTGTTGACAGTGAGCG CCACGATTGTCATCAGGAGAAA TAGTGAAGCCACAGATGTA TTTCTCCTGATGACAATCGTGA TGCCTACTGCCTCGGA
TRIPZ shRNA2	TGCTGTTGACAGTGAGCG CGGCATCCATGTCACCATCTTA TAGTGAAGCCACAGATGTA TAAGATGGTGACATGGATGCCG TGCCTACTGCCTCGGA
TRIPZ shRNA3	TGCTGTTGACAGTGAGCG ACAGCAAAAGGTTGTTCCCTAAA TAGTGAAGCCACAGATGTA TTAGGAACAACCTTTTGCTGGT TGCCTACTGCCTCGGA
TRIPZ shRNA4	TGCTGTTGACAGTGAGCG AGCTCCTAACCTTCTGTAAAC TAGTGAAGCCACAGATGTA GTTTACAGGAAGGTTAGGAGCC TGCCTACTGCCTCGGA
TRIPZ Negativkontrolle	Keine Angaben

2.1.5 Reagenzien für molekularbiologische Methoden

Name	Firma
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Life Technologies
Affymetrix Genchip HumanGene 2.0 ST Array	Affymetrix
Ambion WT Expression Kit	Affymetrix
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth
β -Mercaptoethanol	Roth
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Life Technologies
DNA Away	Carl Roth
Ethidiumbromid	Life Technologies
Hefeextrakt	Carl Roth
Kanamycin Sulfat	Sigma-Aldrich
LB-Agar	Carl Roth
Magnesiumchlorid	Life Technologies
MAP Kinase Signaling Pathway PCR Array	SABioscience
Natriumchlorid	Carl Roth

NFκB Signaling Pathway PCR Array	SABioscience
NucleoSpin Gel und PCR Clean-up	Machery-Nagel
NucleoSpin Plasmid	Machery-Nagel
Orange DNA Loading Dye (6x)	Thermo Fisher
Orange DNA Marker Mix (100 bp-10 000 bp)	Thermo Fisher
PI ₃ K/Akt Signaling Pathway PCR Array	SABioscience
PCR Gold Puffer (10x)	Life Technologies
pENTR TM 5'-TOPO [®] TA Cloning Kit	Life Technologies
pENTR TM Directional TOPO [®] TA Cloning Kit	Life Technologies
Pwo Master	Roche
Quick Change II Site Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
Random Hexamer Primer	Life Technologies
Restriktionsendonukleasen (20 U/μl)	New England Biolabs
Restriktionspuffer NEB1,2,3,4	New England Biolabs
Reverse Transkriptase	Promega
Reverse Transkription Puffer	Promega
Ribunuklease Inhibitor (rNAsin)	Promega
RNAeasy TM Mini Kit	Quiagen
RT ² First Strand Kit	SABioscience
RT ² qPCR Mastermix (2x)	SABioscience
SeaKem [®] LE Agarose	Lonza
S.O.C. Medium	Life Technologies
SYBR Green Mastermix (2x)	Roche
T4 DNA Ligase	Fermentas
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	Fermentas
TA Cloning [®] Kit pCR [®] 2.1 Vektor	Life Technologies
TAE Puffer (50x)	Life Technologies
Trypton/Penton aus Casein	Carl Roth
ViraPower TM HiPerform TM Promoterless Gateway [®] Expression System	Life Technologies

Puffer	Firma
LB-Medium (in 1l Wasser)	
10 g Trypton	Carl Roth
5 g Hefeextrakt	Carl Roth
10 g Natriumchlorid	Carl Roth
LB-Agar (in 1l Wasser)	
40 g LB-Agar	Carl Roth

Plasmide	Firma
pCR2.1	Life Technologies
pENTR™ 5'-TOPO®	Life Technologies
pENTR™ /D-TOPO®	Life Technologies
pLenti6.4/R4R2/V5-DEST	Life Technologies
pTurboGFP-dest1	Evrogen

Primer	Sequenz	Firma
Amplifikation (a)/ q-RT-PCR (b)		
GAPDH forward (b)	CCGAGCCACATCGCTCAGACAC	MWG Eurofins
GAPDH forward (b)	AGCCTTGACGGTGCCATGGAAT	MWG Eurofins
IL-16 Primermix (b)	keine Angaben	Quiagen
IL-16 Promotor forward (a)	GCAGCTCAATATCCGTTTTCCGTC	MWG Eurofins
IL-16 Promotor reverse (a)	GCTGGCTCTTCTCCACCCTGG	MWG Eurofins
TurboGFP forward (a)	CACCATGGAGAGCGACGAGAGCGG	MWG Eurofins
TurboGFP reverse (a)	CACATTGATCCTAGCAGAAGCACAGGCTGCA	MWG Eurofins
TurboGFP forward (b)	GGCTACGGCTTCTACCACTT	MWG Eurofins
TurboGFP reverse (b)	TGAAGATCACGCTGTCTCTCG	MWG Eurofins
TurboGFP Mutagenese ^(H423A) forward	CAGCGCAGGCTTCCCGCCG	MWG Eurofins
TurboGFP Mutagenese ^(H423A) reverse	GGAAGCTGCGTGATATCTCGAGATCTTTCTTC	MWG Eurofins
TurboGFP Mutagenese ^(D433A/D434A) forward	GGTGGCGGCGCAGGCAGCAGGCACGCTGCCCATG	MWG Eurofins
TurboGFP Mutagenese ^(D433A/D434A) reverse	CATGGGCAGCGTGCCTGCTGCCTGCGCCGCCACC	MWG Eurofins
Sequenzierung		
pENTR 5'-TOPO forward	GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC	Life Technologies
pENTR 5'-TOPO reverse	TTAATATATTGATATTTATATCATTTTACG	Life Technologies
pENTR /D-TOPO forward	GTA AACGACGGCCAG	Life Technologies
pENTR /D-TOPO reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	Life Technologies
pLenti6.4/R4R2/V5-Dest forward	GATTAGTGAACGGATCTCGA	MWG Eurofins
pLenti6.4/R4R2/V5-Dest forward	ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT	MWG Eurofins

Chemisch kompetente Bakterien	Firma
Stbl3® (<i>E. coli</i>)	Life Technologies
TOP10® (<i>E. coli</i>)	Life Technologies
XL1-Blue supercompetent cells	Agilent Technologies

2.1.6 Reagenzien für proteinbiochemische Methoden

2.1.6.1 SDS-PAGE und Western Blot

Name	Firma
Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
Amersham™ Hyperbond™ ECL Nitrozellulosemembran	GE Healthcare
Amersham™ Hyperfilm™ ECL Röntgenfilm	GE Healthcare
Antioxidanz	GE Healthcare
Bradford-Lösung (5x)	Bio-Rad
Entwicklungskonzentrat Roentoroll 25	Tental
Fixierkonzentrat Superfix 25	Tental
Geldokumentationssystem	Peqlab Biotech
Gelelektrophoresekammer (DNA Sub Cell)	Bio-Rad
Magermilchpulver	Spinnrad
NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel	Life Technologies
NuPAGE® Antioxidant	Life Technologies
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Life Technologies
NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x)	Life Technologies
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)	Life Technologies
NuPAGE® Transfer Buffer (20x)	Life Technologies
Prestained Protein Marker V	Peqlab Biotech
Protease-Inhibitor Cocktail cOmplete Mini EDTA-free	Roche
PureLink® HighPure Plasmid Maxiprep Kit	Life Technologies
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Quiagen
Reblot Solution (10x)	Millipore
Tween-20	Sigma-Aldrich
Whatman-Papier	Bio-Rad
Puffer	Firma
Blockpuffer (in PBS)	
5 % Magermilchpulver	Spinnrad
0,02 % NaN ₃	Merk
Laufpuffer (in Wasser)	
5 % NuPAGE MES SDS Running Buffer	Life Technologies
PBS-T (in PBS)	
0,1 % Tween 20	Sigma Aldrich
Transferpuffer	
5 % NuPAGE® Transfer Buffer	Life Technologies
10 % Methanol	Merck
0,01 % NuPAGE® Antioxidant	Life Technologies

Primärantikörper	Reaktivität	Spezies	Verdünnung	Firma
anti-Caspase-3	Human	Maus	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-GAPDH	Human	Maus	1:5000	Santa Cruz
anti-IL-16	Human	Maus	1:1000	R&D Systems
anti-V5-Tag		Maus	1:5000	Invitrogen

Sekundärantikörper	Reaktivität	Label	Verdünnung	Firma
anti-IgG	Maus	HRP	1:5000	R&D Systems

2.1.6.2 ELISA und ELISPOT

Name	Firma
ELISpot Blue Color Module	R&D Systems
Human IL-16 ELISpot Development Module	R&D Systems
Human IL-16 Quantikne ELISA Kit	R&D Systems
MultiScreen-IP Filterplatte (0,45 µm); PVDF	Millipore

2.1.6.3 Caspase-3 Aktivitätstest

Name	Firma
Bortezomib	Apotheke Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Caspase-3 Colorimetric Assay	BioVision

2.1.7 Reagenzien für die Durchflusszytometrie

Name	Firma
Annexin V Bindungspuffer	BD Bioscience
APC BrdU Flow Kit	BD Bioscience
BD FACS Lysing Solution	BD Bioscience
IC Fixierungspuffer	eBioscience
Life/Dead Fixable Dead Stain Kit Aqua	Life Technologies
Permeabilization Wash Buffer	Biolegend

Puffer	Firma
FACS Färbepuffer (in PBS)	
0,1 % FCS	Life Technologies
0,02 % NaN ₃	Merk

Antikörper	Reaktivität	Spezies	Label	Firma
Annexin V	Human	Maus	APC	Cell Signaling Technology
anti-GAPDH	Human	Maus	FITC	Santa Cruz
anti-IL-16	Human	Maus	PE	R&D Systems

2.1.8 Verwendete Software

Name	Firma
Affymetrix Expression Console	Affymetrix Inc.
Affymetrix GeneChip Command Console	Affymetrix Inc.
BD FACSDiva	BD Bioscience
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc.
Ingenuity IPA	Ingenuity Systems
Microsoft Office	Microsoft Corporation
R	R Foundation for Statistical Computing
Quantity One	Bio-Rad
RT ² ProfilerT ^M PCR Array Data Analysis Software	SABioscience
Vector NTI Advance	Life Technologies
Volocity Software	PerkinElmer

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen der Sicherheitsstufe 2 und mit vorgewärmten (37 °C) Lösungen. Vor Aufnahme der Arbeiten wurde die Arbeitsfläche gründlich mit 80 %igem Ethanol gereinigt. Fortan wurden stets sterile Arbeitsmaterialien verwendet. Alle Zellen wurden bei 37 °C unter einer wasserdampfgesättigten, 5 %gen CO₂-Atmosphäre in einem Brutschrank kultiviert.

Die Zentrifugationsbedingungen wurden für alle Zelllinien einheitlich gewählt und betragen 5 min bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 350 x g.

2.2.1.1 Kultivierung und Passagieren von Zelllinien

- HEK-293T (konfluente Zellen):

Die HEK-293T wurden in DMEM-Zellkulturmedium, inklusive 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. Sie wurden alle 2-3 Tage in einem Verhältnis von 1:5 geteilt und neu passagiert. Hierzu wurden die konfluenten Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend für ca. 5–10 min trypsiniert, bis sie sich vollständig ablösten. Durch das

Hinzufügen von FCS-haltigen Kulturmedium wurde die Enzymtätigkeit des Trypsins inaktiviert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet erneut mit PBS gewaschen, um das restliche Trypsin zu entfernen. Abschließend wurden 1/5 der Ausgangszellmenge in frischem Kulturmedium aufgenommen und neu passagiert.

- Zelllinien des Multiplen Myeloms (Suspensionszelllinien):

Zelllinien des Multiplen Myeloms wurden in RPMI-Zellkulturmedium, inklusive 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die einzige Ausnahme bildete EJM, deren Kultivierung im IMDM-Zellkulturmedium, inklusive 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin erfolgte. Die Suspensionszellen wurden alle 3 - 4 Tage in einem Verhältnis 1:2 geteilt und neu passagiert. Hierzu wurden die Zellen zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und 1/2 der Ausgangszellmenge in frischem Kulturmedium aufgenommen und neu passagiert.

- Lentiviral transduzierte Myelomzellen

Lentiviral transduzierte Myelomzellen wurden grundsätzlich unter gleichen Bedingungen kultiviert und passagiert, wie es im vorhergehenden Absatz beschrieben wurde. Zusätzlich wurde das Zellkulturmedium mit dem Selektionsmarkern Puromycin (3 µg/ml, TRIPZ-Vektoren) oder Blastocidin (4 µg/ml, pLenti6.4-Vektoren) versetzt, um eine reine Kultur von Zellen mit lentiviraler Integration ins Genom aufrecht zuhalten. Bei TRIPZ-transduzierten Zellen, in denen die Transgenexpression induziert werden sollte, wurden mit 1,5 µg/ml Doxycyclin behandelt.

2.2.1.2 Isolieren und Kultivieren von Lymphozyten

Aus humanen Vollblutspenden wurden nach dessen Zentrifugation Lymphozytenkonzentrate gewonnen, die als *Buffy Coats* bezeichnet werden. Diese *Buffy Coats* wurden vom Blutspendedienst des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt. Aus den *Buffy Coats* pathologisch unauffälliger Spender wurden zunächst die mononukleären Zellen (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) isoliert. Es wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, welche die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten) in der Interphase vom Plasma und den Thrombozyten (obere Phase) sowie den Erythrozyten und den Granulozyten (untere Phase) trennt. Als Gradient wurde Ficoll (Dichte: 1,007 g/ml) verwendet, das mit einer 1:2 in PBS verdünnten *Buffy Coat*

Lösung überschichtet wurde. Es wurde 15 min bei 1000 x g ohne maschinelle Bremskraft zentrifugiert. Die gewonnenen PBMCs aus der Interphase wurden mit PBS gewaschen und für 5 min in Erylysepuffer aufgenommen, um die verbleibenden Erythrozyten zu entfernen. Nach nochmaligen Waschen mit PBS konnten die PBMCs weiterverwendet werden.

Die gemischte PBMC Population wurde mit allogenen Feederzellen in RPMI-Medium kultiviert. Das Kulturmedium wurde mit humanen Seren T-Zell-spezifischen Stimuli (IL-2, PHA) versetzt. Dadurch wurde eine selektive Expansion der T-Lymphozyten, nicht jedoch der anderen mononukleären Zellen gewährleistet.

2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Adhärente Zelllinien wurden in einer subkonfluenten Wachstumsphase kryokonserviert. Auch bei Suspensionszellen wurde der Zeitpunkt der logarithmischen Wachstumsphase eingehalten. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, bevor sie im Einfriermedium resuspendiert und in einer Zelldichte von $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen/ml in ein Kryotube überführt wurden. Die Zellen wurden übergangsweise in einem Isopropanol-Einfrierbehälter verstaut, der einen konstanten Temperaturabfall von $1^\circ\text{C}/\text{min}$ innerhalb des -80°C Gefrierschranks gewährleistet. Nach 1 - 3 Tagen wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff transferiert.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryotube ca. 1 min im 37°C warmen Wasserbad geschwenkt und die Zellen unmittelbar danach in zehnfachen Volumen vorgewärmten Mediums aufgenommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert, zur Entfernung des restlichen DMSO erneut mit PBS gewaschen und anschließend im entsprechenden Kulturmedium aufgenommen.

2.2.1.4 Zellzahlbestimmung

Voraussetzung für die korrekte Zellzahlbestimmung war eine sorgfältig resuspendierte homogene Zelllösung. Ein Aliquot dieser Zelllösung wurde in einem Verhältnis von 1:2 - 1:100, je nach erwarteter Zelldichte, in Trypan Blau aufgenommen. Dieser Farbstoff haftet an der Zellmembran viabler Zellen, ist jedoch nicht membrangängig. Die Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend mit dunkelblauer Zellmembran. Bei toten bzw. nicht-viablen Zellen mit einer perforierten Membran tritt das Chromophor auch in das Zellplasma über, was den Zellen eine gesamtflächige dunkelblaue Farbe verleiht und sie dadurch von den viablen Zellen unterscheidet. $10 \mu\text{l}$ des Zell - Trypan Blau Gemischs wurden auf eine Neubauer-Zählkammer

aufgetragen, die in 4 Großquadrate unterteilt ist. Um eine hohe Genauigkeit zu erzielen, wurden die viablen Zellen aller Großquadrate gezählt und die Zellzahl nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Gesamtzellzahl der 4 Großquadrate}}{4}$$

2.2.2 Proliferationsassay

Neben der manuellen Zellzahlbestimmung wurde der Proliferationsassay zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens durchgeführt. Die Bestimmung des proliferativen Verhaltens basiert auf der Inkorporation des ^3H -Thymidin in die DNA während des Replikationsprozesses vor der Zellteilung. Der Nachweis der Inkorporationsintensität als Maß der Zellteilungshäufigkeit erfolgte mithilfe eines Beta-Counters, der die Zerfallsereignisse der inkorporierten Wasserstoffisotope detektiert.

Zur Ermittlung der Proliferationsstärke der Zelllinien des Multiplen Myeloms wurden die Zellen innerhalb ihrer logarithmischen Wachstumsphase entnommen und 1×10^5 Zellen/Well in einer 96-Well Flachbodenplatte ausgesät. Zu jedem Well wurden 37 kBq ^3H -Thymidin hinzugefügt und die Zellen für 16 h unter herkömmlichen Zellkulturbedingungen inkubiert. Mithilfe des MicroBeta FilterMate-96 Harvesters wurden die Zellen auf eine Filtermatte transferiert, die mit Szintillationsflüssigkeit benässt in eine geeignete Hülle eingeschweißt und durch den Beta-Counter ausgelesen wurde.

Zur Charakterisierung des proliferativen Verhaltens von Myelomzelllinien bei unterbundener IL-16 Expression wurden an Tag 3 nach Knockdown-Induktion 5×10^4 Zellen/Well ausplattiert und an Tag 4 mit 37 kBq ^3H -Thymidin behandelt. Das weitere Vorgehen erfolgte nach dem eben beschriebenen Protokoll.

2.2.3 Viabilitätsassays

Zur Viabilitätsbestimmung wurde ein MTT-Assay durchgeführt. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide] ist ein gelbes membrangängiges Tetrazoliumsalz, das durch NADH und NADPH sowie mitochondriale Dehydrogenasen vitaler Zellen in einer Redoxreaktion metabolisiert werden kann, was zur Bildung von violetten Formazan-Kristallen führt.²⁶⁴ Diese Kristalle sind nicht mehr

membrangängig und verbleiben in unbeschädigten Zellen. Die Zugabe eines Lysepuffers solubilisiert die Kristalle, deren Farbstoff dann colorimetrisch ausgelesen werden kann. Die Menge des reduzierten Farbstoffes korreliert mit der Glykolyserate und ist ein Maß der metabolischen Fitness der Zellen.

Für den Vergleich der metabolischen Aktivität von Myelomzellen intakter IL-16 Expression mit denen herabregulierter IL-16 Expression wurden täglich von Tag 0 bis Tag 7 nach Induktion des Knockdowns 5×10^4 Zellen/Well in einem Volumen von 100 μl einer 96-Well Flachbodenplatte ausplattiert. Nach Zugabe von 10 μl einer MTT-haltigen Lösung wurden die Zellen 2 h unter physiologischen Bedingungen inkubiert. Die Lyse und Solubilisierung der gebildeten Formazankristalle geschah durch Zugabe von 200 μl eines detergenzenthaltenden Lysepuffers. Nach erneuter 2 stündiger Inkubation, diesmal bei Raumtemperatur, erfolgte die colorimetrische Erfassung der Signalstärke (*optical density*, OD) in einem Multiwell-Spektrophotometer bei einer Absorptionswellenlänge von 570 nm. Zur vergleichenden Auswertung wurde die gemessenen OD_{570} um das Hintergrundsignal (OD_{570} eines Wells ohne Zellen) reduziert. Um der hohen Schwankungsanfälligkeit des Assays gerecht zu werden und ihn über den Verlauf trotz dessen valide auszuwerten, wurde er insgesamt sechsmal mit je 3 technischen Replikaten ausgeführt und die Ergebnisse als absolute Differenz der entsprechenden Kontrollen dargestellt.

2.2.4 Colony Formation Assay

Mithilfe eines *Colony Formation Assay* wurde Fähigkeit des klonen Wachstums IL-16 negativer und IL-16 positiver Zellen verglichen. Dafür wurden Myelomzellen über einen Zeitraum von 14 Tagen in einem viskosen Medium kultiviert, dessen Cytokinzusätze darauf abgestimmt waren, insbesondere das Wachstum von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu stimulieren (MethoCult™).

Der Versuch startete am vierten Tag nach Induktion der shRNA Expression. Pro Bedingung wurden 2 ml MethoCult™ in einem 15 ml Falcon vorgelegt. Die Zellsuspension wurde separat in einem Volumen von 200 μl vorbereitet. Neben den $2,2 \times 10^4$ Zellen waren 33 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin und je nach Bedingung 16,5 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin enthalten. Die 200 μl wurden zu den 2 ml MethoCult™ hinzugefügt und der Mix wurde zehnmal mit einer 1 ml Pipette auf und ab pipettiert, um die Lösung zu homogenisieren. Dabei musste akribisch darauf geachtet werden, Luftblasen zu vermeiden. Je 1 ml der homogenen, viskosen Zellsuspension wurde in eine

6 cm Petrischale pipettiert. Pro Bedingung wurden zwei Ansätze vorbereitet. Die Endkonzentration betrug 1×10^4 Zellen pro Petrischale, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin und bei Ansätzen für die shRNA Expressionsinduktion 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin. Die zwei 6 cm Petrischalen wurden mit einer weiteren 6 cm Petrischalen, die mit Wasser befüllt wurde, in eine 10 cm Petrischale gestellt und mit geschlossenem Deckel für 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die gebildeten Kolonien unter dem Durchlichtmikroskop ausgezählt.

2.2.5 Life Cell Imaging

Für das *Life Cell Imaging* wurde in einem Plexiglasaufsatz des konfokalen Mikroskops eine Zellkulturatmosphäre mit 37 °C und 5 % CO₂ imitiert. Es wurden 175.000 pLenti_IL-16Prom_TurboGFP-dest transduzierte Zellen in neun Wells einer 12-Well Platte ausgesät, die zuvor durch FCS Entzug synchronisiert wurden. Die restlichen drei Wells wurden mit Wasser befüllt. In den Plattendeckel wurde mit einer erhitzten Kanüle ein Loch geschmolzen, welches Teil des Begasungssystems bildete. Über eine 100 μl Pipettenspitze wurden die erforderlichen Gase eingeleitet.

Anhand der Volocity Detektions- und Auswertesoftware wurden pro Well drei zu detektierende Ausschnitte definiert. Von diesen Ausschnitten wurden im 15 min Takt über einen Zeitraum von 65 h Phasenkontrast- sowie Fluoreszenzaufnahmen gemacht. Die Phasenkontrastaufnahmen erfolgten im Durchlichtkanal. Die Fluoreszenzintensität des TurboGFPs wurde durch die Anregung mit einem 488 nm Lasers bei einer Emissionswellenlänge von 502 nm erfasst. Die Aufnahmen wurden am Ende des Versuches mittels Volocity Software ausgewertet. Die technische Ausführung des Versuchs wurde durch Daniel Hasche (Masterstudent) übernommen.

2.2.6 Herstellung lentiviraler Partikel

Um eine hohe Biosicherheit zu gewährleisten, fand in der vorliegenden Arbeit das Komplementierungsprinzip der 3. Generation zur Produktion der lentiviralen Partikel Anwendung.^{265–267} Die einzelnen Komponenten, die zur Verpackung retroviraler Vektoren notwendig sind, werden auf vier verschiedenen Plasmiden kodiert. Des Weiteren wurden alle akzessorischen Gene aus dem Expressionssystem eliminiert. Durch diesen Ansatz wird die Entstehungswahrscheinlichkeit von replikationskompetenten Lentiviren sowie deren Virulenz

drastisch reduziert.²⁶⁸ Eines der vier Plasmide ist das Vektorplasmid. Es kodiert für das Transgen unter der Kontrolle eines beliebigen Promotors, jedoch für keine viralen Proteine. Zusätzlich enthält dieses Plasmid die verpackungsrelevanten Elemente RRE und Ψ sowie die flankierenden LTRs (*long terminal repeats*) zur Ermöglichung der reversen Transkription und zur Integration in das Genom der Zielzelle. Zur optimierten Transgenexpression wurden in der vorliegenden Arbeit aus dem pLent6.4-System abgeleitete Vektorplasmide verwendet.²⁶⁹ Für die induzierbare Expression von shRNAmir zur Unterbindung der IL-16 Expression wurde das TRIPZ-Vektorplasmid herangezogen.²⁷⁰ Das zweite Plasmid enthält die kodierende Sequenz für ein beliebiges Hüllprotein und bietet damit die Flexibilität der Pseudotypisierung zur Beeinflussung des Zielzelltropismus. Hier wurde ein Plasmid gewählt, welches das Gen des VSV-G (Glykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus) enthält.²⁷¹ Ein weiteres Plasmid kodiert für das virale Protein Rev. Jenes reguliert transkriptionelle und posttranskriptionelle Prozesse der viralen Genexpression, u. a. unterstützt das Protein beim Kernexport ungespleißter und einfach gespleißter viraler RNA ins Cytoplasma.²⁷² Das vierte Plasmid enthält die restlichen verpackungsrelevanten Strukturgene *gag* und *pol*, deren Genprodukte zur Gestaltung der Matrix und des Kapsids beitragen sowie als Integrase, Protease und reverse Transkriptase fungieren.^{272,273} Da in den entstehenden viralen Partikeln nur das Vektorplasmid, nicht jedoch die anderen drei Plasmide, verpackt wird, beschränkt sich deren Infektionsprozess auf einen Zyklus (Transduktion).

2.2.6.1 Calciumphosphat-Transfektion zur Produktion lentiviraler Partikel

Zur Produktion von lentiviralen Partikeln werden HEK293T-Zellen herangezogen. Für die Dauer der Transfektions- und Produktionsphase wird DMEM-Zellkulturmedium verwendet, welches neben 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin zusätzlich mit 20 mM HEPES versetzt wurde. Ca. 16 h vor der Calciumphosphat-Transfektion wurden 5×10^6 Zellen in einer 10 cm-Zellkultur-Petrischale ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine 70 bis 80 %ige Konfluenz erreichten. Am Tag der Transfektion erfolgte die Herstellung des CaPO_4 -DNA Präzipitats in zwei Stufen. Zunächst werden 15 μg des jeweiligen Vektorplasmids (TRIPZ oder pLenti6.4), 2 μg Hüllplasmid (pCMV-VSV-G), 5 μg pRSV-Rev und 10 μg des *gag/pol*-enthaltenden Plasmids pMDLg/pRRE in einem Gesamtvolumen von 450 μl *Aqua dest.* aufgenommen und 50 μl einer 2,5 M CaCl_2 -Lösung hinzugefügt. Im zweiten Schritt wird dieser Mix tropfenweise unter leichter Durchmischung durch Einblasen von Luft mittels Peleusball zu

500 µl 2x HBS-Puffer gegeben. Zur Präzipitatbildung wurde der Ansatz 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Derweil wurde das Zellkulturmedium der HEK293T-Zellen durch 10 ml frisches Medium mit dem Zusatz von 25 µM Chloroquine ersetzt. Abschließend erfolgte die tropfenweise Verteilung der CaPO₄-DNA Kristalle auf den Zellen. Nach 8-stündiger Inkubation der Zellen unter physiologischen Bedingungen wurde das Kulturmedium erneut durch 8 ml frisches Medium ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt sollte die Transfektion abgeschlossen sein und die Virusproduktion eingesetzt haben. Nach jeweils 24 h und 48 h wurden die Virusüberstände geerntet und über eine 0,45 µm-porige Membran sterilfiltriert, um Zelltrümmer zu entfernen. Nach dem Aliquotieren wurden die virusenthaltenden Überstände bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.6.2 Titration lentiviraler Partikel

Die Ermittlung der Virustiter basierte auf der Detektion fluoreszierender Reportergene (TRIPZ-System) bzw. fluoreszenter Transgene (pLenti6.4-System), die nach erfolgreicher Transduktion von den Zielzellen exprimiert wurden. Einen Tag vor der Transduktion wurden 5×10^4 HEK293T-Zellen in 500 µl Zellkulturmedium in einer 24-Well Platte ausgesät. Am nächsten Tag fand ein Mediaustausch statt. Das frische Medium enthielt kein FCS, wurde jedoch mit 8 µg/ml Polybren versetzt. Die Virusüberstände wurden zu unterschiedlichen Volumina (0,25 µl, 0,5 µl, 1 µl, 5 µl, 10 µl, 100 µl) auf die Zielzellen gegeben. Nach 6 h wurde das virusenthaltende Medium durch frisches Vollmedium ersetzt. Bei der Titration der TRIPZ-basierten lentiviralen Partikel wurde zum Vollmedium zusätzlich 1,5 µg/ml Doxycyclin hinzugefügt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, einmal mit PBS gewaschen und die Anzahl der Zellen ermittelt, die das Reporterprotein (TRIPZ) bzw. das fluoreszierende Transgen (pLenti6.4) exprimierten. Die Titerberechnung wurde anhand der Proben vorgenommen, deren Anteil positiver Zellen bei 5 - 20 % lag. Bei dieser Transduktionsrate ist eine Einfachintegration am wahrscheinlichsten. Mehrfachintegrationen würden zur Unterschätzung der viralen Titer führen.²⁷⁴

Die Berechnung der infektiösen Partikel pro ml erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Infektiöse Viruspartikel/ml} = \frac{\text{Anzahl ausplattierter Zellen} \times \text{relativer Anteil fluoreszierender Zellen}}{\text{eingesetztes Volumen des Virusüberstandes}}$$

2.2.7 Lentivirale Transduktion von Zielzellen

Für die lentivirale Transduktion zur stabilen Integration von Transgenen in das Genom der Zielzelle wurden ca. 16 h vor Transduktion (bei adhärennten Zellen) bzw. zum Zeitpunkt der Transduktion (bei Suspensionszellen) 5×10^4 Zellen in 500 μl des entsprechenden Zellkulturmediums (bei Suspensionszellen: serumfreies Medium, inkl. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Polybrene) in einer 24-Well Platte ausgesät. Bei adhärennten Zellen wurde das Zellkulturmedium ebenfalls durch serumfreies Medium, inkl. 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Polybren ersetzt. Ein bestimmtes Volumen der zuvor titrierten Virusüberstände wurde zu den Zellen hinzugefügt. Das Verhältnis zwischen der eingesetzten Zellen sowie infektiösen Viruspartikeln wird als MOI (*multiplicity of infection*) bezeichnet. Dieses Verhältnis gibt jedoch keinen Aufschluss über die Anzahl der potentiell infizierten Zellen oder der Integrationshäufigkeiten ins Genom. Insbesondere bei der Verwendung unterschiedlicher Zellen zur Titration und zur Transduktion können dazu per se keine validen Aussagen getroffen werden, da die Infektionseffizienz von Zelltyp zu Zelltyp abweicht.²⁷⁵ Nach 12 h wurde das virusenthaltende Medium durch Vollmedium ersetzt. Die Transduktionseffizienz der Zielzellen wurde nach weiteren 12 h mithilfe des durchflusszytometrischen Nachweises der Reportergenexpression überprüft.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Isolierung

Zur Vorbereitung für die RNA-Isolierung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Das Pellet von 2×10^5 Zellen wurde in 350 μl RLT-Puffer inkl. 10 % β -Mercaptoethanol aufgenommen und bis zur Isolierung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die weitere Aufreinigung und Anreicherung der Gesamt-RNA geschah mithilfe des RNAeasyTM Mini Kits in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers. Die RNA wurde in 35 μl RNase freiem Wasser eluiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte durch eine photometrische Messung mittels Nanodrop durch Erfassung der Signalstärke (OD, *optical density*) bei einer Anregung von 260 nm. Die zusätzliche Messung der OD bei 230 nm und 280 nm erfolgte zur Bestimmung von Kontaminationen von Proteinen (280 nm) und Lösungsmittelrückständen (230 nm). Die

Quotienten von $OD_{260}/OD_{230} \geq 2$ sowie $OD_{260}/OD_{280} \geq 1,8$ stehen für reine DNA. Für reine RNA gelten die Quotienten $OD_{260}/OD_{230} \geq 2$ sowie $OD_{260}/OD_{280} \geq 2$.

2.3.3 Überprüfung der RNA-Qualität

Zur Überprüfung der RNA-Integrität, ein reziprokes Maß von RNA-Degradationslevel, wurde die isolierte RNA mithilfe des Agilent RNA 6000 Nano Kits für die Messung am Agilent 2100 Bioanalyzer nach Empfehlung des Herstellers vorbereitet und anhand des Programms „*Eukaryote Total RNA Nano*“ ausgewertet. Dabei werden alle RNA-Moleküle verschiedener Längen erfasst und die Gesamtheit der Probe durch die Einheit RIN (*RNA integrity number*) beschrieben. Der höchste RIN-Wert ist 10 und repräsentiert intakte RNA. Eine graduelle Degradation wird durch eine kontinuierliche Verschiebung zu kurzen RNA-Fragmenten reflektiert, was sich in einem sinkenden RIN-Wert widerspiegelt. Vollkommen degradierte RNA wird durch einen RIN-WERT von 1 beschrieben.²⁷⁶ Um valide Expressionsdaten zu erheben wurden RNA-Proben mit RIN = 9,3 – 10,0 für weitere Analysen ausgewählt.

2.3.4 Reverse Transkription

Mithilfe der reversen Transkription konnte aus der isolierten RNA cDNA synthetisiert werden. Ein Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten (Tabelle 1):

Tabelle 1: Zusammensetzung des Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

Komponente	Menge/Ansatz
RNA	700 ng
Random-Hexamer Primer	3 µg
dNTPs	2 nmol
10x Reaktionspuffer	1 x
MgCl ₂	6,25 nmol
RNAsin	20 u
Reverse Transkriptase	15 u
add RNase-freies Wasser	20 µl

Die Proben wurden zunächst für 45 min bei 42 °C, danach für 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach Abschluss der reversen Transkription wurden 15 µl zu jeden Ansatz hinzugefügt, so dass eine cDNA-Konzentration von 20 ng/µl vorlag. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.3.5 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (q-RT-PCR) beruht auf dem Prinzip der konventionellen PCR, ermöglicht darüber hinaus jedoch die Quantifizierung des amplifizierten Produkts. Im vorliegenden Fall erfolgte die Quantifizierung anhand von Fluoreszenzsignalen des Farbstoffes SYBR-Green, einem DNA-interkalierenden Farbstoff, dessen Signalintensität positiv mit der vorhandenen DNA-Menge korreliert, nicht aber zwischen verschiedenen Amplifikaten differenziert. Zur Überprüfung der Primerspezifität fand daher im Anschluss jeder Messung eine Schmelzkurvenanalyse statt. Brachte diese nur einen Peak hervor, dessen dazugehörige Temperatur mit der Länge des Amplifikats korrelierte, konnte von einer spezifischen Bindung der Primer sowie einer valide verlaufenden q-RT-PCR ausgegangen werden.

Die Vorbereitungen der q-RT-PCR erfolgten an einem DNA-Away gereinigten Arbeitsplatz um die Gefahr der Kontamination zu umgehen. Zusätzlich fanden ausschließlich gestopfte Spitzen Anwendung. Um trotzdem eventuell auftretende Verunreinigungen zu detektieren, wurde pro Mastermix eine Wasserkontrolle gemessen. Alle Pipettierarbeiten erfolgten auf Eis. **Tabelle 2** beschreibt die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die q-RT-PCR

Tabelle 2: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die q-RT-PCR

Komponente	Menge/Ansatz
Template (cDNA)	80 ng
Primermix	4 pmol
SYBR Green Mastermix Roche (2x)	1 x
add Wasser	20 µl

Die Messung der Proben erfolgte im Lightcycler 96[®] mit folgendem Temperaturprofil (**Tabelle 3**):

Tabelle 3: Temperaturprofil der q-RT-PCR

Phasen	Temperatur und Zeit (GAPDH)	Temperatur und Zeit (IL-16)	Temperatur und Zeit (TurboGFP)	
Enzymaktivierung	95 °C/ 10 min	95 °C/ 10 min	95 °C/ 10 min	
Amplifikation (45 Zyklen)	Denaturierung	95 °C/ 10 sec	95 °C/ 10 sec	
	Annealing	61 °C/ 5 sec	65 °C/ 20 sec	61 °C/ 5 sec
	Elongation	72 °C/ 30 sec	72 °C/ 30 sec	72 °C/ 30 sec
Schmelzkurve	55 °C – 95 °C (1 °C/sec)	55 °C – 95 °C (1 °C/sec)	55 °C – 95 °C (1 °C/sec)	

Die erste Phase des Temperaturprofils diente der Aktivierung der Polymerase. Daran schließen sich 45 Zyklen der klassischen PCR-Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation an. Die Detektion der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes SYBR-Green erfolgte jeweils am Ende einer Elongationsphase. Abschließend wurde eine Schmelzkurve für jede Probe erstellt. Bei 95 °C wurden alle DNA-Doppelstränge denaturiert und die Temperatur anschließend auf 55 °C erniedrigt, so dass sich die Einzelstränge wieder paaren. Es folgte eine schrittweise Erhöhung der Temperatur um 1 °C in 30 s und eine Signaldetektion auf jeder Temperaturstufe zur Erstellung der Schmelzkurve, mit der die Reinheit des Amplifikats und damit die Primerspezifität beurteilt werden konnte.

Für die Auswertung der q-RT-PCR erfolgte über die absolute Quantifizierung. Sie basiert auf einer Kalibrierungskurve, d. h. sie kann nur angewendet werden, sofern über einen Standard verfügt wird. Ist diese Voraussetzung erfüllt, kann eine absolute Kopienzahl berechnet werden. Für die Erstellung einer Kalibrierungskurve wurde eine Verdünnungsreihe eines Plasmids herangezogen, welches die zu amplifizierende cDNA-Sequenz des jeweiligen Gens beinhaltet. Anhand der Plasmidgröße konnte das Molekulargewicht und daraus wiederum die cDNA-Kopienzahl/μl innerhalb der entsprechend konzentrierten Plasmidlösung kalkuliert werden.

$$\text{Kopienzahl}/\mu\text{l} = \frac{\text{Plasmidkonzentration}}{\text{Länge des Plasmids (bp)} \times \text{ØMW}_{\text{Base}} (\times 2 \text{ (bei doppelsträngigen Plasmiden)})} \times \text{Avogadro-Konstante}$$

Die höchste Standardkonzentration betrug 1×10^9 cDNA-Kopien/μl. Es wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe bis zu einer Konzentration von 1×10^6 cDNA-Kopien/μl angesetzt und in jedem q-PCR-Lauf gemessen. Die Ct-Werte wurden gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentrationen aufgetragen, auf dessen Grundlage eine Standard-Regressionsgerade erstellt wurde. Anhand der Zuordnungsvorschrift der Standardkurve konnte über die Ct-Werte der untersuchten Proben ihre Kopienzahl berechnet werden.

2.3.6 Genexpressionsanalyse mittels Microarray

Zur Erstellung vergleichender Expressionsprofile von Myelomzelllinien unveränderter bzw. herunterregulierter IL-16 Expression wurden mit der Unterstützung der Firma Atlas Biolabs GmbH (Berlin, GER) Microarray-Analysen durchgeführt.

2.3.6.1 Praktische Durchführung der Microarray-Analysen

Die RNA-Isolierung, Reinheitskontrolle, Konzentrationsbestimmung und Qualitätsanalyse erfolgten auf herkömmliche Weise (siehe Kapitel 2.3.1-2.3.3). Anschließend wurde die RNA in cRNA umgeschrieben und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Ambion WT Expression Kit). Dann folgte die Hybridisierung der markierten cRNA an die transkriptspezifischen Oligonukleotidsequenzen, welche auf der Quarzoberfläche des Chips immobilisiert wurden. Für die Analyse des Expressionsprofils wurde der Affymetrix Genchip *HumanGene 2.0 ST Array* gewählt, welcher eine simultane Erfassung der Expression von 40.716 Transkripten bzw. 30.645 Genen erlaubt.²⁷⁷ Durch Waschen wurde die ungebundene cRNA entfernt und die verbleibenden Fluoreszenzsignale auf dem Chip mittels Affymetrix GeneChip Command Console Software detektiert und quantifiziert. Die Signalintensität ist positiv korreliert zur Stärke der Genexpression. Die praktische Durchführung der reversen Transkription, Hybridisierung und Auslesen des Chips übernahm die Firma Atlas Biolabs GmbH.

2.3.6.2 Bioinformatische Auswertung der Microarray-Analysen

Für die Auswertung der erhaltenen Daten wurden verschiedene bioinformatische Verfahren und unterschiedliche bioinformatische Programme verwendet, die im Folgenden kurz erläutert werden. Ziel dabei war es, aus der Datenmenge differenziell regulierte Gene herauszufiltern und diese später in einen funktionellen Kontext einzugliedern.

Zunächst erfolgten Hintergrundkorrektur, verteilungsbasierte Quantilnormalisierung und eine logarithmische Datentransformation der Signalstärken nach der RMA-Methode²⁷⁸ (*robust multi-array average algorithm*) unter Verwendung der Affymetrix Expression Console Software. Da gerade Werte im niedrigen Signalbereich hohe Varianzen sowie Anfälligkeiten für falsch positive Ereignisse aufweisen, wurden Transkripte des unteren Signalstärke-Quartils aus den weiteren Analysen ausgeschlossen. In dem Fall waren es Transkripte, die in allen zwölf Datensätzen eine $\log_2(\text{Signalstärke}) \leq 3,5$ zeigten. Die Datenfilterung wurde mithilfe des statistischen Auswerteprogramms *R* vorgenommen. Bei den verbleibenden Transkripten wurde zur Signifikanzbestimmung ein ungepaarter t-Test unter Berücksichtigung ungleicher Varianz durchgeführt. Gegenübergestellt wurden dabei die jeweiligen Transkripte der Versuchs- und der Kontrollgruppe.

Als Maß der Genregulierung wurden die logarithmischen Signalstärken der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe verglichen, wodurch sich ein *Signal-log-Ratio* ($\text{SLR} = \log_2(\text{Signal}_{\text{Probe}}) -$

$\log_2(\text{Signal}_{\text{Kontrolle}})$ für jedes Transkript ergab. Für die Identifizierung differenziell regulierter Gene wurde ein Schwellenwert von $p \leq 0,01$ und $\text{SLR} \leq -0,4$ bei herunterregulierten sowie $\text{SLR} \geq 0,4$ bei hochregulierten Genen definiert. Die Strenge des Signifikanzniveaus hatte das Ziel, die Gefahr der falschpositiven Benennung zu reduzieren, da eine klassische Korrektur, wie beispielsweise nach Bonferroni, aufgrund des zu geringen Probenkollektivs nicht angewendet werden konnte. Als Ausweichstrategie wurden die statistischen Kriterien enger gefasst.

Die Cluster-Analyse zur hierarchischen Abbildung des Verwandtschaftsgrades der einzelnen Proben wurde mit dem statistischen Auswerteprogramm *R* vorgenommen. Die zu einem Gen zuordenbaren Transkripte werden in der Cluster-Analyse zu einem Signal aggregiert. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Datensätze sowie stringenterer, visuell unterstützte Aussagen über die Stärke der Expressionsdifferenz zu erhalten, wurden die logarithmierten Signale der verschiedenen Gene zu einem medianzentrierten Expressionssignal transformiert. Mit der Pearson-Korrelation als Distanzmaß und der durchschnittlichen Linkage-Methode wurden die Proben dann hierarchisch gebündelt.

Die Zuordnung der regulierten Gene in verschiedene biofunktionelle Gruppen erfolgte mithilfe der Ingenuity-Software.²⁷⁹

2.3.7 Signalwegfokussierte Genexpressionsanalyse mittels PCR Array

Mit dem q-RT-PCR basierten System wurden der MAP-Kinase, NF κ B sowie der PI₃K/Akt Signalweg analysiert. Die RNA-Isolierung, Reinheitskontrolle, Konzentrationsbestimmung und Qualitätsanalyse erfolgten auf herkömmliche Weise (siehe Kapitel 2.3.1-2.3.3). Es wurden 200 ng RNA mithilfe des RT² First Strand Kits in cDNA umgeschrieben. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers. Für den q-RT-PCR-basierten Nachweis der Genexpression 84 verschiedener Gene wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet (Tabelle 4):

Tabelle 4: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den q-RT-PCR-basierten Superarray

Komponente	Volumen
Template (cDNA)	102 μ l
2x SABioscience RT ² qPCR Master Mix	1350 μ l
Wasser	1248 μ l

Pro Well einer PCR Array-Platte wurden 25 μ l des Reaktionsansatzes hinzugefügt. Die Messung am Lightcycler erfolgte nach dem in Tabelle 5 dargestelltem Temperaturprofil.

Tabelle 5: Temperaturprofil der PCR Array des q-RT-PCR-basierten Superarray

Phasen	Temperatur	Zeit
Enzymaktivierung	95 °C	10 min
Amplifikation (40 Zyklen)	Denaturierung	95 °C
	Annealing	55 °C
	Elongation	72 °C
Schmelzkurve	55 °C – 95 °C	1 °C/sec

Die generierten Daten wurden mithilfe der webbasierten RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis Software ausgewertet.

2.3.8 Klonierungen

2.3.8.1 Präparation genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA aus humanen Zellen wurde das QIAamp Blood DNA Mini Kit verwendet. Die unterschiedlichen Aufreinigungsschritte wurden in Anlehnung an das Herstellerprotokoll durchgeführt. Die DNA wurde in 50 µl Wasser eluiert.

2.3.8.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus Minikulturen von Bakterien erfolgte mithilfe des NucleoSpin Plasmid Kit nach Herstellerangaben. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in 50 µl Wasser eluiert und deren DNA-Konzentration spektrophotometrisch ermittelt. Bei größeren Mengen zu isolierender Plasmid-DNA aus Maxikulturen wurde das PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die gefällte Plasmid-DNA wurde in 250 µl Wasser aufgenommen und deren DNA-Konzentration ebenfalls spektrophotometrisch ermittelt.

2.3.8.3 Plasmidsequenzierungen

Für die Sequenzierung von DNA-Plasmiden wurde der Sequenzierungsservice von MWG Eurofins in Anspruch genommen. Dafür wurde ein Ansatz aus Plasmid-DNA und dem jeweiligen Sequenzierungsprimer vorbereitet und an den Sequenzierungsservice weitergeleitet.

2.3.8.4 Verwendung von Restriktionsendonukleasen

Um die Plasmid-DNA an definierten Sequenzen zu schneiden, wurden Restriktionsendonukleasen verwendet. Bei einem analytischen Verdau mit Restriktionsendonukleasen wurden ca. 150 - 300 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Für eine präparativen Verdau betrug die verwendete Menge an Plasmid-DNA 1 - 2 µg. Außerdem beinhaltet ein Reaktionsansatz von 20 µl Endvolumen 1-10 U des jeweiligen Enzyms, 20 µg BSA und 2 µl des 10x Restriktionspuffers. Der Ansatz wurde 2-3 h bei 37 °C inkubiert. Es schloss sich eine Enzyminaktivierung bei 65 °C an.

2.3.8.5 Agarosegelelektrophorese

Um die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Länge aufzutrennen wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die Agarosekonzentration wurde je nach aufzutrennender Fragmentgröße zwischen 0,8 – 2 % gewählt. Die angelegte Spannung für die Auftrennung betrug 100 V. Die Zeit der Auftrennung richtete sich nach dem gewünschten Auftrennungsgrad und der erwarteten Fragmentgrößen. Sie betrug ca. 1 – 1,5 h. Zur Detektion der aufgetrennten DNA wurde zum Agarosegel Ethidiumbromid zugegeben. Der DNA-interkalierende Farbstoff konnte mithilfe eines Transilluminators detektiert werden.

2.3.8.6 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach einer präparativen Agarosegelelektrophorese wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die Elution der DNA aus dem Gel erfolgte mithilfe des NucleoSpin Gel und PCR Clean-up Kits nach Herstellerangaben. Die DNA-Fragmente wurden in 25 – 50 µl Wasser eluiert.

2.3.8.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Sequenzen wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) durchgeführt. Mit der Wahl der Polymerase konnte eine Anpassung der Fragmentenden vorgenommen werden. Die Amplifikation mit der *Taq*-Polymerase führt zu einem dATP-Überhang am 3'-Ende des Amplifikats. Diese Polymerase besitzt keine 3' → 5'-Exonukleaseaktivität (*Proof Reading*), so dass sich in der amplifizierten Sequenz häufig Mutationen befinden können. Daher ist eine anschließende Sequenzierung essentiell. Die *Pwo*-Polymerase hingegen führt keine dATP-Überhänge ein, besitzt aber die *Proof Reading* Funktion und eignet sich daher zur genauen Amplifikation langer

DNA-Sequenzen. Nichtsdestotrotz wird eine anschließende Sequenzierung empfohlen. Ein PCR-Ansatz mit der *Taq*-Polymerase enthielt die in **Tabelle 6** dargestellten Komponenten.

Tabelle 6: Reaktionsansatz einer Polymerasekettenreaktion mit der Taq-Polymerase

Komponente	Menge/Ansatz
DNA	50 - 150 ng
dNTPs	2 nmol
MgCl ₂	3,125 nmol
Primer forward	2 pmol
Primer reverse	2 pmol
10x Taq Reaktionspuffer	1 x
Taq polymerase	2,5 u
add RNase-freies Wasser	25 µl

DNA-Sequenzamplifikationen mit der Pwo-Polymerase wurden dem Pwo-Master Kit durchgeführt (**Tabelle 7**).

Tabelle 7: Reaktionsansatz einer Polymerasekettenreaktion mit der Pwo-Polymerase

Komponente	Menge/Ansatz
DNA	50-150 ng
Primer forward	2 pmol
Primer reverse	2 pmol
2x Pwo Master	1 x
add RNase-freies Wasser	50 µl

Für das Temperaturprofil wurde die herkömmliche Aufeinanderfolge von Denaturierung, Annealing und Elongation gewählt, die von einer initialen Denaturierung und einer finalen Elongation flankiert wurde. Die Annealingtemperatur richtete sich nach den eingesetzten Primern und wurde mithilfe des *T_m-Calculators* bestimmt.²⁸⁰

2.3.8.8 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

Die Aufreinigung der PCR-Amplifikate dient der Entfernung von dNTPs und Primerdimeren sowie dem Pufferaustausch. Dafür wurde das NucleoSpin Gel und PCR Clean-up Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution des aufgereinigten Amplifikats erfolgte in 25 - 50 µl Wasser.

2.3.8.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von linearisierten Plasmiden und DNA-Fragmenten erfolgte durch Anwendung der T4 DNA Ligase. Das Insert wurde in einem dreifach molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl in 1x Ligasepuffer und mit 1 U T4 DNA Ligase bei 16 °C für ca. 16 h durchgeführt. Der Ligation schloss sich stets eine Transformation kompetenter Bakterien an.

2.3.8.10 Transformation kompetenter Bakterien

Die zu transformierenden chemisch kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 – 10 ng Plasmid-DNA (Ligationsansatz) bzw. 0,5 ng Plasmid-DNA (Plasmidretransformation) versetzt. Die Plasmidzugabe erfolgte ohne Einwirkung mechanischer Schwerkkräfte. Die Bakterien wurden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 45 s in ein 42 °C warmes Wasserbad getaucht. Der Transformationsansatz wurde unmittelbar danach für 2 min auf Eis gelagert. Nun folgte die Zugabe von 250 µl S.O.C. Medium und die einstündige Inkubation im Schüttelinkubator bei 37 °C. 20 – 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Antibiotikakonzentrationen im LB-Agar betragen 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin.

2.3.8.11 Ansetzen von Mini- und Maxikulturen von Bakterien

Bakterienkulturen wurde im LB-Medium expandiert, welches mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde. Die Konzentration des Zusatzes betrug 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin. Das Ansetzen der Minikulturen erfolgte durch das Picken einer Bakterienkolonie auf der LB-Agarplatte mit einer sterilen 100 µl Pipettenspitze. Die Spitze wurde in 4 ml LB-Medium überführt. Über Nacht erfolgte die Vermehrung der klonalen Bakterien im Schüttelinkubator bei 37 °C und 190 rpm.

Zur weiteren Expansion der Bakterien wurden Maxikulturen angesetzt. Dafür wurden 100 ml LB-Medium (inkl. Antibiotikum) mit 500 µl der Minikultur angeimpft und über Nacht bei gleichen Bedingungen im Schüttelinkubator inkubiert.

2.3.8.12 Klonierungsstrategien

- Klonierung der Standardplasmide für die quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion
Die Amplifikation der partiellen Gensequenzen erfolgte aus genomischer DNA mithilfe der jeweiligen q-RT-PCR Primer von GAPDH und IL-16. Da ein 3'dATP Überhang erforderlich war, wurde die Taq-Polymerase verwendet. Die PCR Produkte wurden aufgereinigt und mit dem linearisierten pCR®2.1 Plasmid ligiert. Als Standardplasmid für die q-RT-PCR von TurboGFP wurde das kommerziell erworbene Plasmid pTurboGFP-dest 1 verwendet.

- Klonierung des IL-16 Promotorplasmids

Analog zu den Standardplasmiden erfolgte die Amplifikation der IL-16 Promotorsequenz aus der genomischen DNA mithilfe der Taq-Polymerase. Nach Aufreinigung des PCR Produkts wurde dieses mit dem linearisierten pENTR 5'TOPO Vektor unter Verwendung des pENTR™ 5'TOPO® TA Cloning Kits ligiert, wodurch ein zirkuläres Plasmid entstand, welches später für die Generierung von Expressionsvektoren herangezogen wurde (pENTR 5'Topo-IL-16Prom).

- Klonierung destabilisierter TurboGFP Varianten

Die Klonierung von TurboGFP Plasmiden mit unterschiedlichen PEST-Sequenzen zur Destabilisierung des Reportergens basierte auf der zielgerichteten Mutagenese des kommerziell erworbenen Plasmids pTurboGFP-dest 1 (Variante 1). Bei der dest-Variante 2 fand der Aminosäureaustausch H423A mithilfe einer *Overlap Extension* PCR statt, bei der das Plasmid pTurboGFP-dest1 als Matrize diente. Es waren drei verschachtelte PCR-Ansätze erforderlich, bei denen jeweils die Pwo-Polymerase verwendet wurde. Bei der dest-Variante 3 wurde ein doppelter Aminosäureaustausch D433A/D434A vorgenommen. Dazu wurde das QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit nach Herstellerangaben verwendet. Hier wurde ebenfalls das Plasmid pTurboGFP-dest1 als Matrize verwendet.

Die Sequenz aller drei TurboGFP-dest Varianten wurden mithilfe einer Pwo-basierten PCR amplifiziert und aufgereinigt. Durch den Forward Primer wurde eine 5' CACC Sequenz eingeführt, die für die sich anschließende Ligation essentiell war. Die Ligation der TurboGFP-dest cDNA mit dem pENTR/D-TOPO Vektor erfolgte durch Anwendung des pENTR™ Directional TOPO®Cloning Kits nach Herstellerangaben. Dabei entstanden die

Plasmide pENTR/D-TOPO_TurboGFP-dest1, pENTR/D-TOPO_TurboGFP-dest2 und pENTR/D-TOPO_TurboGFP-dest3.

- Klonierung der IL-Promotor/TurboGFP-dest Expressionsvektoren

In einer Rekombinationsreaktion aus den Eintrittsvektoren pENTR 5'Topo-IL-16Prom und pENTR/D-TOPO_TurboGFP-dest1,2,3 sowie dem Expressionsplasmid pLenti6.4/R4R2/V5-DEST wurde die Expressionsvektoren generiert, die anschließend für die Herstellung lentiviraler Partikel eingesetzt wurden. Die Rekombinationsreaktion erfolgte mit dem ViraPower™ HiPerform™ Promotorless Gateway® Expression System in Anlehnung an die Empfehlung des Herstellers. Auf diese Weise wurden die drei Expressionsvektoren pLenti6.4_IL-16Prom_TurboGFP-dest1, pLenti6.4_IL-16Prom_TurboGFP-dest2 und pLenti6.4_IL-16Prom_TurboGFP-dest3 generiert. Die Klonierung der verschiedenen TurboGFP-dest Varianten und die Generierung der Expressionsvektoren wurde innerhalb der Arbeitsgruppe von Daniel Hasche (Masterstudent) durchgeführt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 SDS-PAGES und Western Blot

Um Proteine in Zelllysaten und Zellkulturüberständen nachweisen zu können, wurde das Proteingemisch der jeweiligen Lösung zunächst mittels Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend des Molekulargewichtes aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Proteinnachweis basierte auf dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörpersystem.

- Herstellung der Lysate

Je nach Fragestellung wurden unterschiedlich viele Zellen für die Lysatherstellung herangezogen. Die Zellen wurden der Zellkultur entnommen und 1 x mit PBS gewaschen, um das FCS des Zellkulturmediums zu entfernen. Nach dem Waschen wurden sie entsprechend ihrer Zellzahl in einem definierten Volumen des Lysepuffers aufgenommen. Beispielsweise wurden 2×10^5 Zellen in einem Lysepuffervolumen von 50 μ l aufgenommen und sorgfältig resuspendiert. Es schloss sich eine 20 minütige Inkubation auf Eis an, die insgesamt dreimal zum Vortexen der Proben unterbrochen wurde. Nachdem die Zellstrukturen aufgebrochen wurden, erfolgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 x g. Der Überstand

enthielt alle löslichen intrazellulären Proteine. Die Lysate wurden aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

- Aufkonzentrieren der Zellkulturüberstände

Für die Western Blot Analysen wurden je nach Fragestellung unkonzentrierte oder aufkonzentrierte Zellkulturüberstände eingesetzt. Für den letzten Fall wurden die Überstände folgendermaßen behandelt:

Die Zellkulturüberstände wurden in einem dreifachen Volumen eiskaltem Aceton aufgenommen, 10 min bei -20 °C gelagert und anschließend bei 4.500 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet enthielt die gefällten Proteine und musste noch vom restlichen Aceton befreit werden. Dazu wurden die Falcontubes ohne Deckel unter einem Luftabzug mit leichtem Unterdruck gestellt, so dass das verbleibende Aceton verdampfen konnte. Anschließend wurde das getrocknete Pellet in einem entsprechenden Volumen Lysepuffer aufgenommen und für Western Blot Analysen verwendet.

- Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mithilfe eines Bradfordassays vorgenommen. Für die Erstellung der Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe von einer BSA-Lösung vorbereitet (10,0 mg/ml; 7,5 mg/ml; 5,0 mg/ml; 2,5 mg/ml; 1,0 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml). Alle Zelllysate und alle Proben der Standardreihe wurden 1:4 in PBS verdünnt und anschließend im Bradfordassay eingesetzt. Für alle Ansätze inkl. Standardreihe wurde die Proteinkonzentration in Duplikaten ermittelt. Hierzu wurden in einer 96-Well Platte 118 µl PBS pro Well vorgelegt. Anschließend wurden 2 µl des jeweiligen Ansatzes in das entsprechende Well zugegeben. Durch das Hinzufügen von 40 µl Bradfordlösung wurden die Ansätze entsprechend ihrer Proteinkonzentration Blau angefärbt. Die Farbintensität wurde am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm ausgelesen. Anschließend konnte anhand der Standardreihe die Konzentration ermittelt werden.

- SDS-PAGE

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteingemische wurden je nach Fragestellung verschiedene Proteinmengen aufgetragen. Hierfür wurden kommerziell erworbene Gradientengele verwendet. Pro Ansatz wurde die gewünschte Proteinmenge in einem

Endvolumen von 15 μ l in PBS aufgenommen. Außerdem wurden 5 μ l Ladepuffer (enthält SDS) und 2 μ l einer reduzierenden Lösung (enthält β -Mercaptoethanol) zugegeben. Der Mix wurde für 5 min bei 95 °C aufgekocht und anschließend auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Kombination von SDS, β -Mercaptoethanol und dem Erhitzen bricht alle nichtkovalenten Bindungen auf, zerstört Disulfidbrücken und führt zu einer einheitlich negativen Ladung der Proteine. Die Gelelektrophoresekammer wurde vollständig mit Laufpuffer befüllt. Die Auftrennung erfolgte bei 195 V für 45 min. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel für den Western Blot weiterverwendet.

- Western Blot Analysen

Alle Glasfasermatten sowie Whatmanpapiere wurden gründlich mit Transferpuffer benässt. Die Nitrozellulosemembran wurde vorerst in Wasser, dann in Transferpuffer getränkt. Die Elemente der Western Blot Kammer wurden dann folgendermaßen gestapelt: 3 Glasfasermatten, 1 Whatmanpapier, 1 Polyacrylamidgel, 1 Whatmanpapier, 3 Glasfasermatten. Nach dem Zusammenbau der Kammer wurde diese im inneren Bereich mit Transferpuffer gefüllt. Das Befüllen der äußeren Kammer geschah mit Leitungswasser. Der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte mit einer angelegten Spannung von 40 V für 1 h. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran für 1 h mit Blockpuffer gesättigt. Der Primärantikörper wurde in Blockpuffer verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf die Membran gegeben. Die Entfernung des primären Antikörpers erfolgte durch zweimaliges kurzes Waschen mit Wasser sowie dreimaliger zehnmütiger Inkubation mit PBS-T. Der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurde im Blockpuffer verdünnt und für 1 h auf die Membran gegeben. Das Entfernen dieses Antikörpers geschah auf gleiche Weise, wie beim Primärantikörper. Die Membran wurde nun mit der chemiluminiszenten Substratlösung benetzt und für 2 min inkubiert. Mithilfe von Whatmanpapier wurde die Substratlösung wieder entfernt. Die Signaldetektion fand in einer Dunkelkammer statt. Die Röntgenfilme wurden für angemessene Expositionszeiten auf die Membran gelegt. Die Signale wurden im Röntgenfilmentwickler sichtbar gemacht. Wenn es erforderlich war, erfolgte die densitometrische Quantifizierung mithilfe der *Quantity One* Software (Bio-Rad)

- Entfernen gebundener Antikörper

Neben dem Zielprotein wurde stets ein Referenzprotein als Ladekontrolle nachgewiesen. Dafür war es notwendig, die Primär- und Sekundärantikörper der ersten Färbung von der

Membran zu entfernen (*Membran Stripping*). Die Membran wurde dafür 5 min in TBS-T, dann 5 min in Wasser inkubiert. Es schloss sich eine 20 minütige Behandlung mit der 1x Reblot Lösung an, welche das Loslösen der Antikörper von der Membran herbeiführt. Die Membran wurde dann 5 min mit Wasser und 5 min in TBS-T gewaschen. Die zweite Färbung erfolgte nun analog zur Ersten, beginnend mit der Blockierung der unspezifischen Bindungen.

2.4.2 ELISA

Der ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren zur Quantifizierung von Proteinkonzentrationen in Lösungen unterschiedlichen Ursprungs und wurde in dieser Arbeit verwendet, um die IL-16 Konzentrationen im Zellkulturüberstand von Myelomzelllinien zu bestimmen. Dafür wurden die Zelllinien während einer optimalen Wachstumsphase in einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ml Zellkulturmedium in einer 24-Well Platte ausgesät. Nach 72 h wurden die Zellkulturüberstände geerntet und durch Zentrifugation von den Suspensionszellen befreit. Der IL-16 Quantikine ELISA (R&D) wurde gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Zellkulturüberstände wurden dabei in einer Verdünnung von 1:2 eingesetzt und die Konzentration über eine simultan gemessene Standardreihe absolut quantifiziert.

2.4.3 ELISPOT

Der ELISPOT-Assay (*Enzyme-linked-immuno-Spot*) ist ein sensitives Verfahren zur Quantifizierung cytokinsekretierender Zellen auf Einzelzellniveau. Anders als bei einem ELISA bildet bei dieser Methode nicht die sekretierte Cytokinmenge das Untersuchungsobjekt, sondern die Anzahl der Zellen innerhalb einer Population, die unter bestimmten Bedingungen zur Cytokinsekretion befähigt sind. Die Angabe Spot forming units (SFU)/getesteter Zellen gilt daher als typisches Quantifizierungsmaß des ELISPOTs.

Zum Nachweis der IL-16 sekretierenden Zellen wurde auf die IL-16 spezifischen Antikörper des Human IL-16 ELISpot Development Module (R&D Systems) und das entsprechende Protokoll des Herstellers zurückgegriffen. Im ersten Schritt wurde die hydrophobe PVDF-Membran einer 96-Well Multiscreenfilterplatte mit 30 %igem Ethanol befeuchtet und zweimal mit PBS gewaschen. Nun konnte die Membran ü. N. bei 4 °C mit dem ersten monoklonalen cytokinspezifischen Antikörper (Capture-Antikörper) beschichtet werden. Nach dreimaligem

Waschen wurden die freien Bindungsstellen durch die zweistündige Behandlung mit einem Blockpuffer abgedeckt, der ebenfalls durch dreimaliges Waschen entfernt wurde. Die Myelomzelllinien wurden während ihrer logarithmischen Wachstumsphase der Zellkultur entnommen und in einer dekadischen Verdünnungsreihe (1×10^5 - 1×10^2 Zellen/Well) mit technischen Dublikaten ohne weitere Stimuli in ihrem herkömmlichen Kulturmedium ausplattiert und 16 h unter physiologischen Bedingungen inkubiert. Das während der Inkubation sekretierte IL-16 wurde von dem ersten monoklonalen Antikörper abgefangen und haftete somit ebenfalls fest an der PVDF-Membran. Nach Entfernen aller Zellen durch viermaliges Waschen wurden die sekretierten, am Capture-Antikörper gebundenen Cytokine durch einen zweiten cytokinspezifischen biotinylierten Antikörper erkannt (Detektionantikörper). Über eine nichtkovalente Bindung wurde an das Biotin des Detektionsantikörpers AP-konjugiertes Streptavidin geknüpft. Die enzymatische Umsetzung des Substrates BCIP/NBT durch die alkalische Phosphatase führte zur Bildung von indigofarbenden Spots auf der PVDF-Membran, die jeweils eine cytokinsekretierende Zelle repräsentierten. Die Wells wurden mittels ELISPOT-Reader ausgelesen.

2.4.4 Caspase-3 Aktivitätsassay

Der Nachweis und die relative Quantifizierung der Caspase-3 Aktivität erfolgte mithilfe des Caspase-3 Colorimetric Assay Kits. Dies basierte auf der spektrophotometrischen Detektion des Chromophores *p*NA nach dessen Abspaltung von der Aminosäuresequenz DEVD, einer Zielstruktur der aktiven Caspase-3. Zum Nachweis der spontanen Caspase-3 Aktivität wurden Lysate unbehandelter Zellen hergestellt. Die apoptoseassoziierte Caspase-3 Aktivität erfolgte anhand von bortezomibbehandelten Zellen (25 nM, 16 h). Die Farbentwicklung wurde mithilfe des ELISA-Readers detektiert. Die erhaltenen Werte wurden einer Hintergrundreduktion sowie einer Normalisierung auf die eingesetzte Proteinmenge unterzogen. Als Referenzzelllinie wurden HEK293T Zellen eingesetzt.

2.5 Durchflusszytometrische Methoden

Die Durchflusszytometrie bietet viele Möglichkeiten, Zellen sehr differenziert zu charakterisieren. Es können intrazelluläre Antigene und Oberflächenmoleküle gefärbt werden, die eine Zuteilung der Zellen zu einer bestimmten Zellpopulation ermöglichen. Dies bietet

gleichzeitig die Möglichkeit zur Durchführung von Expressionsanalysen. Weiterhin können Zellstrukturen angefärbt werden, was wiederum Auskunft über den Zustand einer Zelle innerhalb einer Zellpopulation liefert. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Antigene als auch Zellstrukturen angefärbt. Die Detektion der Zellfärbung wurde am LSR Fortessa vorgenommen.

- Intrazelluläre Antigenfärbung

Für die intrazelluläre Antigenfärbung wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen. Es folgte die 20 minütige Fixierung bei Raumtemperatur sowie eine Membranpermeabilisierung durch zweimaliges Waschen mit dem Permeabilisierungspuffer. Anschließend konnten intrazelluläre Antigene angefärbt werden. Hierzu wurden die Antikörper entsprechend der Empfehlung des Herstellers in FACS Färbepuffer verdünnt und die Zellen in dem Antikörpermix für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die ungebundenen Antikörper werden durch einmaliges Waschen mit dem Permeabilisierungspuffer entfernt und die Zellen für die anschließende durchflusszytometrische Detektion in FACS Färbepuffer aufgenommen.

- Zellzyklusanalysen

Die Markierung der verschiedenen Zellen entsprechend ihrer Zellzyklusphasen basiert zum einem auf deren Replikationsverhalten sowie dem DNA-Gehalt innerhalb der einzelnen Zellen. Replizierende Zellen bauen bei der DNA-Synthese das Thymidin Analogon BrdU in die DNA ein, welches mit einem anti-BrdU Antikörper angefärbt werden kann. Auf diese Weise werden Zellen identifiziert, die sich in der S-Phase befinden. Der fluoreszierende Farbstoff 7-AAD interkaliert mit der DNA. Die Signalstärke korreliert positiv mit dem DNA Gehalt. Zellen in der G₀/G₁-Phase haben einen einfachen Chromosomensatz, während die Zellen in der G₂-Phase einen doppelten Chromosomensatz aufweisen. Mithilfe der 7-AAD Färbung können demnach diese beiden Populationen voneinander abgegrenzt werden.

Für die Durchführung der Zellzyklusanalysen wurde das BrdU Flow Kit verwendet. Sie fand in Anlehnung an das Herstellerprotokoll statt. In Kürze beschrieben umfasste es die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, den DNase Verdau zur besseren Erreichbarkeit des inkorporierten BrdU durch den BrdU spezifischen, APC-gekoppelten Antikörper sowie das Anfärben der DNA mit 7-AAD. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Bei Fragestellungen, in denen die Zellzyklusanalyse mit einer intrazellulären Antigenfärbung verknüpft wurde, erfolgte zunächst die anti-BrdU Färbung und nach einmaligen Waschen und Pufferaustausch die Färbung mit dem Antikörpermix gegen intrazelluläre Antigene. Die Färbung mit 7-AAD schloss sich unverändert an.

- Apoptose-Assay

Mithilfe einer Doppelfärbung konnte der zelltodassoziierte Zustand der Zellen in vier Phasen unterteilt werden. Als erster Farbstoff wurde APC-gekoppeltes Annexin V gewählt, um Phosphatidylserine der Zellmembran anzufärben. Im viablen Zustand der Zellen sind die Phospholipide der Zellmembran nach innen gerichtet und die Phosphatidylserine für das Annexin V nicht zugänglich. Durch die Einleitung der Apoptose geht die Asymmetrie der Zellmembran verloren und die Phospholipide flippen nach außen. Dadurch kann Annexin V an das Phosphatidylserin binden und diese Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff APC markieren. Der zweite Farbstoff (Aqua) färbt unspezifisch Aminosäuren an. Bei lebendigen Zellen mit intakter Zellmembran werden ausschließlich die auf der Zelloberfläche befindlichen Aminosäuren gefärbt. Bei permeablen Membranstrukturen sterbender Zellen werden zusätzlich intrazelluläre Aminosäuren angefärbt. Dadurch wird eine deutliche Signalverstärkung erzeugt. Doppeltnegative Zellen werden als viabel eingestuft. Einfach Annexin V positive Zellen befinden sich in der frühen Apoptose, während doppelpositive Zellen charakteristisch für die späte Apoptosephase sind. Zellen, die ein starkes Signal angefärbter Aminosäuren zeigen, jedoch keine Annexin V Färbung aufweisen, sind nekrotisch. Vor der Färbung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Im weiteren Schritt wurden die Zellen mit dem Life/Dead Farbstoff (1:100 Verdünnung in PBS) zum Anfärben der Aminosäuren behandelt und für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in Annexin V Bindungspuffer aufgenommen und für 15 min mit APC-gekoppelten Annexin V gefärbt. Die Zellen wurden ohne erneutes Waschen durchflusszytometrisch analysiert.

- Nachweis fluoreszenter Reporterproteine

Für die Titration oder Ermittlung der Transduktionseffizienz wurden ebenfalls Durchflussanalysen durchgeführt. Der heterogene Zellmix, in dem die Expression fluoreszenter Reporterproteine erwartet wurde, wurde vorerst einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen wieder in PBS aufgenommen und die Anzahl der Zellen ermittelt, welche das Reporterprotein exprimierten.

2.6 Statistische Auswertung

Sofern nicht anders darauf hingewiesen wurde, erfolgte die statistische Auswertung mit dem Programm GraphPad Prism V5. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde je Abhängig vom Versuchsaufbau entweder der gepaarte oder der ungepaarte t-Test angewendet. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, so fand die Einweg-ANOVA mit anschließendem post-Test (Tukeys) Anwendung. Die ermittelten Signifikanzen wurden als p-Werte angegeben. Die Abstufung der Signifikanzniveaus war Folgende: $p \leq 0,001$ (**); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,05$ (*)

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Interleukin-16 Expression und Sekretion im Multiplen Myelom

Um die beobachteten Auffälligkeiten der hohen IL-16-Serumlevel im malignen Phänotyp des Multiplen Myeloms und die damit assoziierte schlechte Prognose für den Patienten^{6,255} differenzierter beschreiben zu können, wurde das IL-16-Expressionsprofil zehn verschiedener Myelomzelllinien experimentell verifiziert. Die Untersuchungsobjekte bildeten dabei die Genaktivität auf mRNA-Ebene sowie die Syntheserate auf Proteinebene. Weiterhin erfolgte eine eingehende Beschreibung des IL-16-Sekretionsverhaltens der Myelomzellen.

3.1.1 Intrazelluläre Interleukin-16 Expressionsanalysen

3.1.1.1 Myelomzellen weisen eine hohe Interleukin-16 Genaktivität auf

Zunächst wurde die IL-16-Genaktivität in zehn verschiedenen Myelomzelllinien bestimmt. Dazu wurden die IL-16-mRNA-Expressionslevel mittels q-RT-PCR ermittelt und mit den Expressionslevel aktivierter T-Zellen verglichen (**Abbildung 1A**). T-Zellen wurden umfassend für ihre konstitutive IL-16-Expression sowie mitogeninduzierte IL-16-Sekretion beschrieben^{136,137,151} und wurden daher im vorliegenden Versuch als Positivkontrolle gewählt. Mit Ausnahme der Myelomzelllinie LP-1 zeigten alle weiteren neun getesteten Zelllinien eine deutliche, konstitutive Expression der IL-16-mRNA mit heterogener Genaktivität sowohl innerhalb der getesteten Zelllinien als auch zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (siehe Fehlerbalken **Abbildung 1A**). Auch bei der Zelllinie LP-1 konnte eine IL-16 mRNA-Expression nachgewiesen werden, jedoch waren die relativen Expressionsniveaus ca. 500-mal schwächer als die durchschnittlichen Level der anderen Zelllinien und sind daher in der **Abbildung 1A** kaum erkennbar.

Weiterhin wurden die Expressionslevel von IL-16 auf Proteinebene untersucht. In Western Blot Analysen erfolgte der Nachweis von intrazellulärem Pro-IL-16 (**Abbildung 1B**). Analog zu den mRNA-Expressionsstudien zeigten neun von zehn Myelomzelllinien nachweisbare Pro-IL-16-Proteinlevel. Auch hier waren unterschiedliche Expressionsniveaus beobachtbar. Im Vergleich zu den anderen IL-16-exprimierenden Zelllinien präsentierte U-266 die schwächste IL-16-Proteinmenge. Für die Zelllinie LP-1 war mittels Western Blot kein

Pro-IL-16 nachweisbar. Im Vergleich zur Positivkontrolle zeigten einige Myelomzellen deutliche Proteinüberexpressionen.

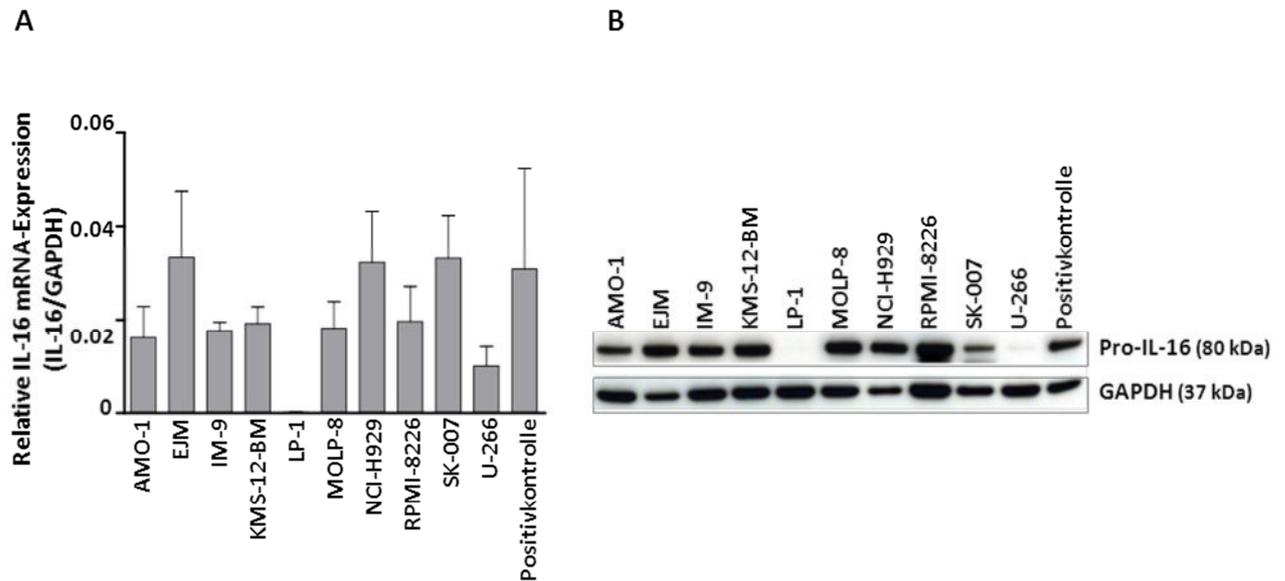


Abbildung 1: Interleukin-16-mRNA und Proteinexpression in Myelomzelllinien

(A) Quantitative RT-PCR zum Nachweis der relativen IL-16-mRNA Expression in Myelomzelllinien. Es wurde der Quotient aus der IL-16-mRNA Kopienanzahl und der GAPDH-mRNA Kopienanzahl (= Referenzgenormalisierung) gebildet. Durch die Höhe der Säulen sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Wiederholungen dargestellt. Die jeweilige Standardabweichung wurde durch die Fehlerbalken abgebildet. (B) Immunoblotanalyse zum intrazellulären Nachweis von Pro-IL-16. Nach der Detektion von IL-16 wurden die gebundenen Antikörper von der Membran entfernt (Membran-Stripping) und das Referenzprotein GAPDH als Ladekontrolle gefärbt. Dargestellt ist ein repräsentativer Immunoblot. Der Versuch wurde insgesamt dreimal unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

Anschließend wurde der Anteil der Zellen innerhalb des Zellkulturpools analysiert, der für die IL-16-Signale in der q-RT-PCR und im Western Blot verantwortlich ist. Dafür wurde mittels Durchflusszytometrie auf Einzelzellebene der Anteil IL-16-positiver Zellen ermittelt. **Abbildung 2A** gibt einen Überblick über das angewandte Gatingschema dieser Fragestellung. Als erstes erfolgte ein Doublettenausschluss. Die Expressionsanalyse wurde dann anhand der viablen Zellen vorgenommen, deren Position im FSC-SSC Dotplot durch Vitalitätsstudien ermittelt wurde (Daten nicht gezeigt). Als Referenz der IL-16-negativen Zellen diente die IgG-Isotypkontrolle des IL-16-spezifischen Antiköpers.

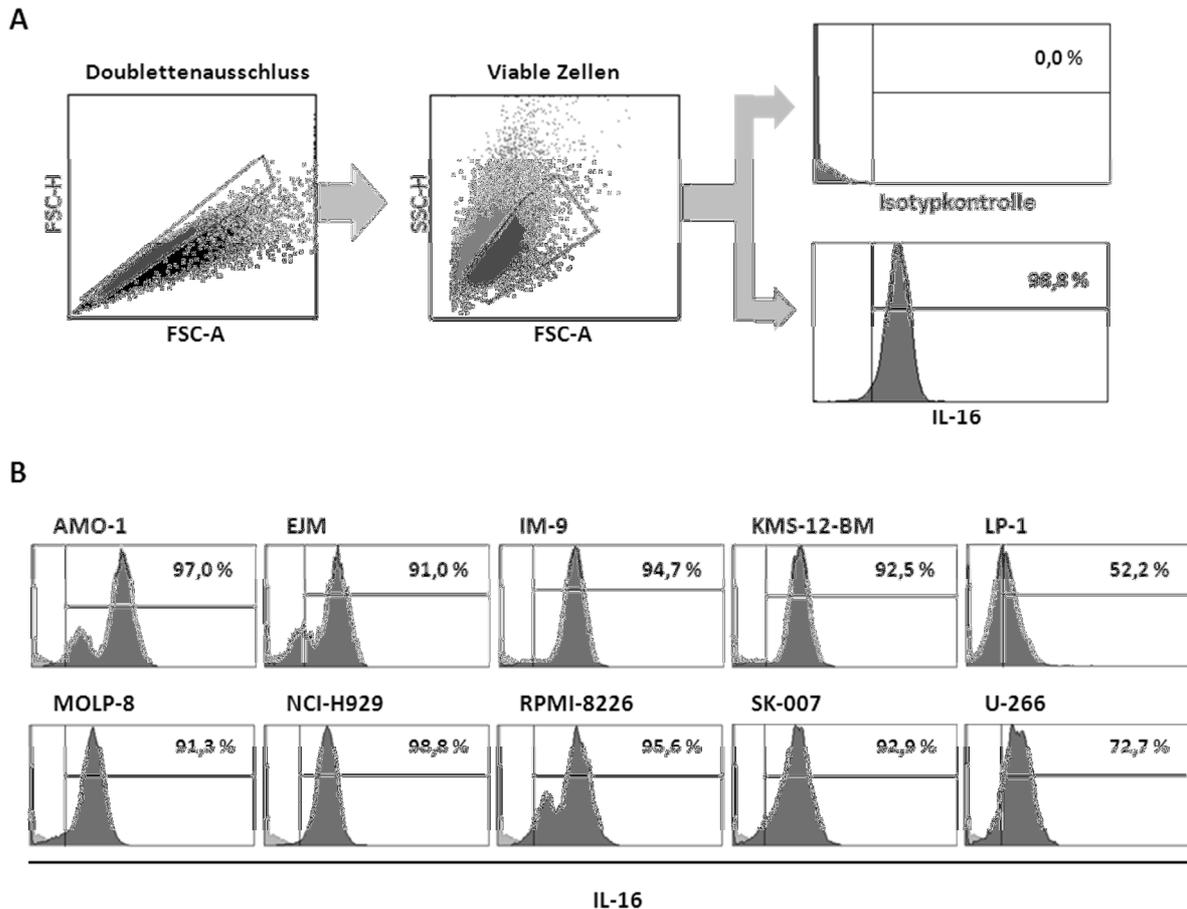


Abbildung 2: Anteil IL-16-exprimierender Myelomzellen innerhalb einer Zelllinie

(A) Für den durchflusszytometrischen Nachweis von intrazellulären IL-16 erfolgte zunächst ein Doublettenausschluss. Anschließend wurden die viablen Zellen auf ihre IL-16-Expression hin untersucht. Ein Beispiel für ein solches Histogramm ist dargestellt (IL-16). Für die Kontrolle der unspezifischen Bindungen des verwendeten Antikörpers wurde eine IgG-Isotypkontrolle gemessen. Das entsprechende Histogramm ist ebenfalls in (A) abgebildet (Isotypkontrolle). (B) Dargestellt ist ein Histogrammoverlay der IgG-Isotypkontrolle (hellgrau) und der Färbung mit dem spezifischen IL-16 Antikörper. Dargestellt sind repräsentative Histogramme von insgesamt dreimal durchgeführten Wiederholungen des Versuchs unter Gleichhaltung der Bedingungen.

In allen der zehn untersuchten Myelomzelllinien konnten IL-16-positive Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 2B**). Der Anteil der positiven Zellen lag bei acht Zelllinien > 90 %. Bei AMO-1, EJM, IM-9, KMS-12-BM und RPMI-8226 war anhand der zwei Peaks zudem eine Unterteilung in schwach positive und stark positive Populationen erkennbar. Wie auch schon in den vorherigen Analysen setzte sich die Zelllinie U-266 mit einem geringeren Anteil IL-16-positiver Zellen von ca. 73 % von den anderen ab. Ebenfalls auffällig war die reduzierte Expressionsstärke innerhalb der positiven Zellen (Linksverschiebung des Peaks). LP-1 repräsentierte mit ca. 48 % die Zelllinie mit dem höchsten Anteil IL-16-negativer Zellen, was sich ebenfalls in den erhobenen IL-16-mRNA-Leveln widerspiegelte. Im Vergleich zu den Zelllinien, die einen hohen Anteil IL-16-positiver Zellen aufwiesen, zeigten die positiven Zellen der Linie LP-1 deutlich schwächere IL-16-Expressionsniveaus, so dass der Übergang von positiv

zu negativ deklarierten Zellen fließend erschien. Aufgrund der hohen Sensitivität der intrazellulären Cytokinfärbung mit anschließender durchflusszytometrischer Detektion war, anders als beim Immunoblot, ein Nachweis von IL-16 in der Zelllinie LP-1 möglich.

Festzuhalten ist, dass die Mehrheit der Myelomzellen eine starke IL-16-Proteinexpression aufweist.

3.1.1.2 Die Expression von Interleukin-16 ist zyklisch reguliert

Bei der Analyse der IL-16-Genaktivität in Zellen des Multiplen Myeloms und bei verschiedenen proteinbiochemischen Verfahren, die auf der Detektion von intrazellulären Pro-IL-16 basierten, wurden trotz identischer Kulturbedingungen deutliche Schwankungen in den IL-16-Expressionslevel beobachtet. Insbesondere galt das für die relative Quantifizierung der IL-16-Transkripte (siehe Fehlerbalken **Abbildung 1**). Jenes ließ vermuten, dass die Expression von IL-16 einer Regulation unterliegt, die von äußeren Stimuli unabhängig ist. Um zu überprüfen, ob sich die Genaktivität innerhalb eines Zeitfensters ändert, wurden die Myelomzellen zunächst durch einen zweistündigen Serumschock synchronisiert und die relativen IL-16-Transkriptionslevel anschließend im Sechsstudentakt über einen Zeitraum von fünf Tagen mittels q-RT-PCR bestimmt. In **Abbildung 3A** sind die Ergebnisse eines Durchlaufs im gleitenden Durchschnitt zweier Wertepaare dargestellt. Erkennbar ist eine zyklische IL-16-Expression, die ca. alle 30 h ihren Tief- bzw. Hochpunkt erreichte. Es konnten bis zu sechsfache Expressionsunterschiede beobachtet werden.

Diese Untersuchungen liefern die ersten Hinweise auf eine mögliche zirkadiane IL-16-Expressionsregulation sowohl generell als auch in Zellen des Multiplen Myeloms.

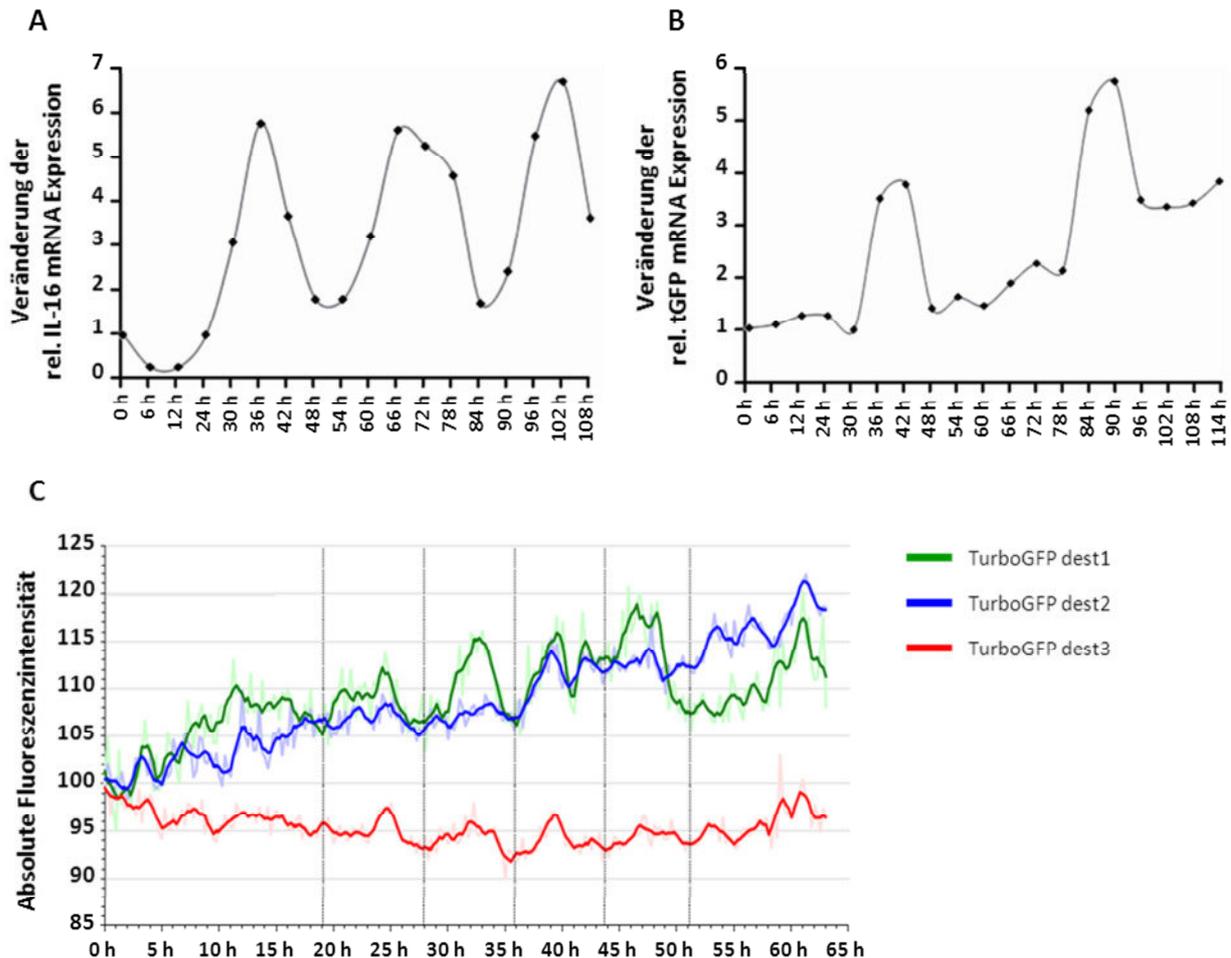


Abbildung 3: Zyklische Regulation der Interleukin-16-Expression

(A) Nach Synchronisation der Zellen wurden alle sechs Stunden die relativen IL-16-mRNA Level der Myelomzellen ermittelt. GAPDH fungierte als Referenzgen. Dargestellt sind die x-fachen Veränderungen der relativen IL-16-mRNA Expression bezüglich des Zeitpunktes 0 h. Der Versuch wurde insgesamt fünfmal wiederholt. Abgebildet ist der Versuch mit der regelmäßigsten Regulation. (B) Analog zu (A) wurden die relativen TurboGFP-mRNA Level erfasst. Myelomzellen wurden dafür mit einem Vektor transduziert, welcher für dieses Gen unter der Kontrolle des IL-16-Promotors kodiert. Dargestellt sind ebenfalls die relativen Veränderungen in Bezug auf den Zeitpunkt 0 h. (C) Mittels *Life Cell Imaging* wurde die Aktivität der TurboGFP Proteinexpression unter Kontrolle des IL-16-Promotors getestet. Zeitgleich wurden drei Konstrukte mit unterschiedlichen Halbwertszeiten untersucht, die in der Fusion verschiedener Destabilisierungssequenzen (dest1, 2 und 3) begründet waren. Aufgrund der engen Messpunkte ergibt sich ein starkes Rauschen der Verbindungslinie (blasse Linien). Um die Regulationen besser darzustellen, wurde ein gleitender Durchschnitt von je vier Messpunkten abgebildet (gesättigte Linien).

Ob sich diese oszillierenden mRNA-Level auch auf die Proteinbiosynthese von IL-16 auswirkt, wurde mittels *Life Cell Imaging* durch die Verfolgung der Expression eines Reportergens eruiert. Aufgrund der langen Halbwertszeit von Pro-IL-16 eignete sich der direkte Proteinnachweis nicht für diese Fragestellung. Um dennoch der Frage nachgehen zu können, erfolgte die Expression des TurboGFP (Reportergens) dabei unter der Kontrolle des IL-16-Promotors. Außerdem wurde das TurboGFP mit einer destabilisierenden Sequenz fusioniert, die zum raschen Proteinabbau führen sollte, damit mögliche Schwankungen in der Proteinsynthese besser sichtbar gemacht werden können. Da diese Destabilisierungseffizienz

von Zelltyp zu Zelltyp divergiert und für Myelomzellen keine Erfahrungswerte vorliegen, wurden insgesamt drei verschiedene Sequenzen mit unterschiedlichen postulierten Halbwertszeiten getestet. Vor der Durchführung des *Life Cell Imaging* wurde dieses System auf Transkriptionsebene getestet. Ziel dabei war es zu prüfen, ob sich die Expression von TurboGFP-mRNA unter der Kontrolle des IL-16-Promotors ebenso zyklisch verhält, wie es für die IL-16-Genaktivität gezeigt werden konnte. Wieder wurden relative IL-16-Expressionsunterschiede bis zu einem Faktor von 6 beobachtet (**Abbildung 3B**). Auch ein Ansteigen und Absinken der TurboGFP-mRNA in einem annähernd periodischen Rhythmus wurde aufgezeichnet, jedoch nicht so gleichmäßig und häufig, wie es für die IL-16-mRNA in **Abbildung 3A** dargestellt war. Möglicherweise ist dies auf ungleiche mRNA-Stabilitäten oder zu weit gefasste bzw. ungünstig gewählte Messpunkte zurückzuführen. Denkbar wäre in der artifiziellen Methode auch ein eingeschränkter Zugang der Transkriptionsfaktoren zum Promotor.

Trotz der beschriebenen Unterschiede wurde anhand des TurboGFP-Systems untersucht, ob die energieaufwendige Regulation der IL-16-Genaktivität Auswirkungen auf die intrazelluläre Proteinmenge hat. Zunächst wurden die Zellen für 2 h synchronisiert. Zum Zeitpunkt 0 wurde mit der Detektion der TurboGFP-Fluoreszenzaktivitäten begonnen, die im 15-minütigen Abstand über einen Gesamtzeitraum von 65 h wiederholt wurde. Die Änderung der Fluoreszenzintensität aller drei TurboGFP-Destabilisierungsvarianten ist in **Abbildung 3C** dargestellt. Nach ungeordneten Schwankungen in der Anfangszeit schien sich bei allen drei Varianten nach ca. 20 h eine regelmäßige, intervallartige Zu- und Abnahme der TurboGFP-Proteinmenge einzustellen. Die Schwankungen sind bei dem Konstrukt 1 am stärksten ausgeprägt. Dessen Halbwertszeit schien daher für die Fragestellung am besten geeignet. Bei allen Destabilisierungsvarianten dauerte ein Intervall ca. 8 h. Nach 55 h wurden die periodischen Schwankungen unschärfer. Zu diesem Zeitpunkt nahm auch die Vitalität der Zellen aufgrund suboptimaler Kulturbedingungen in der *Life Cell Imaging* Vorrichtung ab. Letztlich deuten die Analyseergebnisse darauf hin, dass sich die zyklisch regulierte IL-16-Promotoraktivität in Myelomzellen bis zu einer periodischen Regulation der Proteinbiosynthese auszuwirken scheint.

Sowohl durch die verstärkte Produktion als auch mit der zyklischen Regulation zeigen die Myelomzellen markante IL-16 Expressionsmuster, die auf eine zentrale Bedeutung von IL-16

für die maligne Plasmazelle hindeuten. Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern sich die Auffälligkeiten im IL-16-Sekretionsverhalten der Myelomzellen widerspiegeln.

3.1.2 Das Sekretionsverhalten der Myelomzellen

3.1.2.1 Myelomzellen sekretieren bioaktives Interleukin-16

Bei Immunzellpopulationen des nicht-malignen Phänotyps wird nicht das Pro-IL-16, sondern das prozessierte und sekretierte Cytokin als reifes IL-16 bezeichnet, d. h. es entfaltet auch erst nach Spaltung seine biologische Aktivität. Daher wurde im vorliegenden Abschnitt geprüft, ob Myelomzellen befähigt sind, das reife IL-16 zu produzieren und zu sekretieren.

Anhand einer ELISPOT-Analyse wurde die Anzahl IL-16-sekretierender Zellen bestimmt. **Abbildung 4B** dient der Veranschaulichung des Versuchs und zeigt jeweils ein Versuchswell einer Zelllinie, wobei ein dunkler Punkt eine IL-16-sekretierende Zelle repräsentiert (siehe Kapitel 2.4.3). Die Ergebnisse der genauen Auszählung IL-16-sekretierender Zellen innerhalb einer Versuchspopulation sind in **Abbildung 4A** als *Spot forming Unit* (SFU) dargestellt, die sich ebenfalls in „% der IL-16-sekretierenden Zellen“ ausdrücken lässt (Bsp: $SFU_{IM-9} = 930\,000/1 \times 10^6$ Zellen \equiv 93 % IL-16-sekretierender Zellen). IM-9 und MOLP-8 wiesen mit > 90 % den höchsten Anteil IL-16 sekretierender Zellen auf. In den Populationen AMO-1, KMS-12-BM und NCI-H929 sekretieren ca. 83-84 % der Zellen IL-16, bei RPMI-8226 sind es 78 %. SK-007 und EJM wiesen mit 69 % bzw. 54 % eine größere Subpopulation IL-16-sekretierender Zellen auf, als die aktivierten T-Zellen (Positivkontrolle; $SFU = 340\,000/1 \times 10^6$ Zellen). Konsistent zu den zuvor beschriebenen Expressionsmodellen zeigten sich U-266 und LP-1 als Zelllinien mit dem geringsten Anteil IL-16-sekretierender Zellen. U-266 hatte eine SFU von $320\,000/1 \times 10^6$ Zellen. Bei LP-1 zeigten unter gegebenen Kulturbedingungen nur 0,09 % der Zellen die Fähigkeit zur IL-16-Sekretion.

Es ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen der relativen Anzahl der Zellen, die intrazelluläres IL-16 exprimieren und dem Anteil der IL-16-sekretierenden Zellen. Dabei gilt, je stärker die intrazelluläre Cytokinexpression, desto höher die Anzahl der IL-16-sekretierenden Zellen ($\rho = 0,935$; $R^2 = 0,874$; $p < 0,0001$)^a. Demnach wird das überexprimierte IL-16 nicht als funktionsloses Pro-IL-16 intrazellulär gespeichert, sondern wird prozessiert und das C-terminale Fragment zum Ausüben der biologischen Funktion sekretiert.

^a ermittelt über Pearson-Korrelation

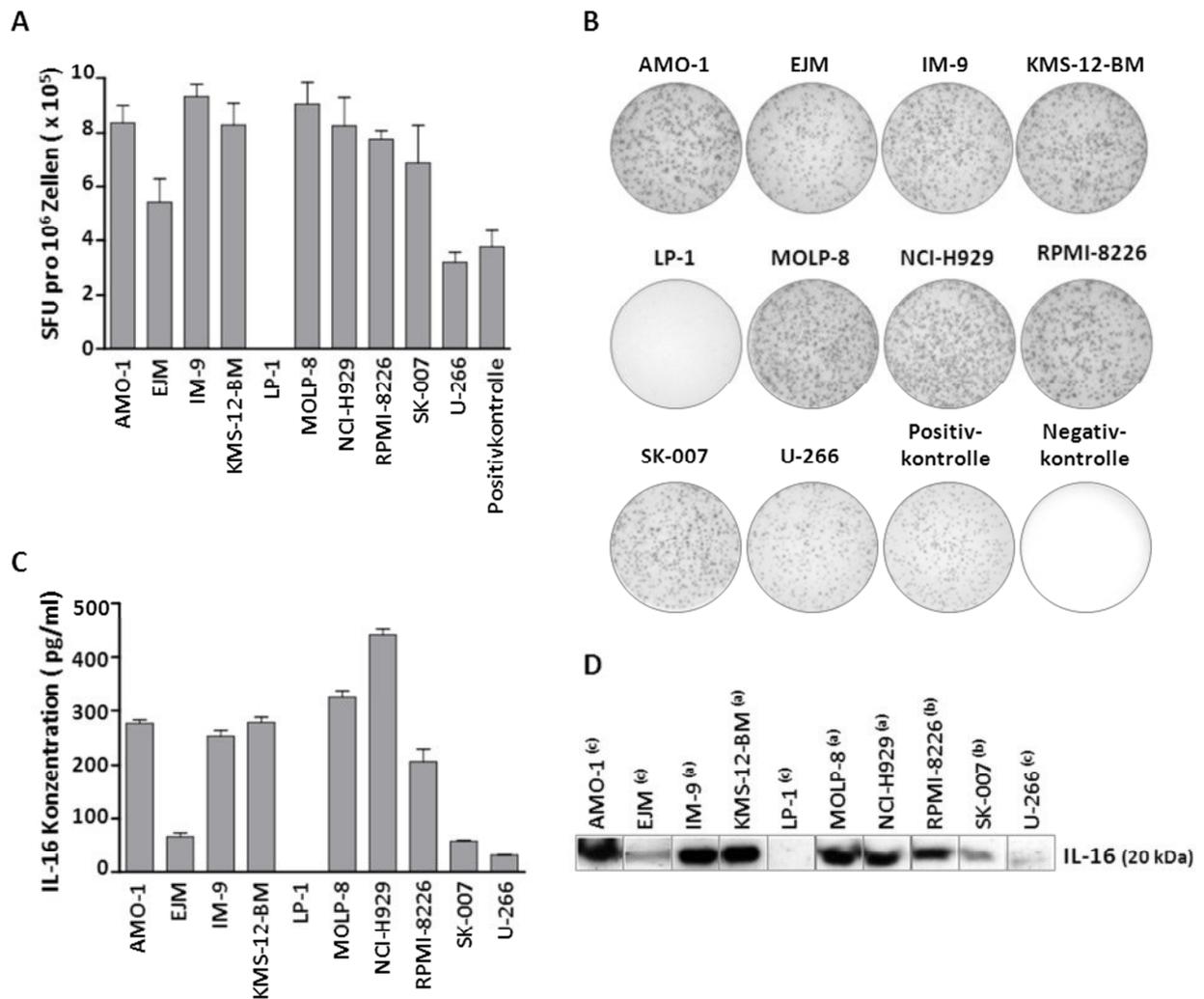


Abbildung 4: Interleukin-16-Sekretion durch Zellen des Multiplen Myeloms

(A-B) Der Anteil IL-16-sekretierender Zellen wurde anhand eines ELISPOTs ermittelt. Die Zellen wurden über Nacht unter physiologischen Bedingungen auf der zuvor mit IL-16-spezifischen Antikörpern behandelten PVDF-Membran inkubiert. Während dieser Zeit sekretiertes IL-16 wurde nach Entfernen der Zellen mit einem Detektionsantikörper nachgewiesen. (A) zeigt die genaue Auszählung der Spots von drei unabhängigen Wiederholungen (Säulen entsprechen den Mittelwerten Fehlerbalken der Standardabweichung. (B) Zur Veranschaulichung der ELISPOT-Methode sind die am Ende eines Versuches auszählenden Wells gezeigt. (C) Die sekretierte IL-16-Proteinmenge wurde mittels ELISA bestimmt. Dafür wurden die Zelllinien drei Tage unter physiologischen Bedingung kultiviert und der konditionierte Überstand für die Analyse eingesetzt. Der Versuch wurde ebenfalls dreimal wiederholt. (Statistik siehe A). (D) Immunoblot zur Detektion des reifen, bioaktiven IL-16 in aufkonzentrierten Zellkulturüberständen. Die hochgestellten Buchstaben geben Auskunft über die jeweilige Belichtungszeit zur Detektion der dargestellten Banden: (a) = 1 min; (b) = 5 min; (c) = 45 min.

Da mithilfe des ELISPOTs lediglich der relative Anteil der IL-16-sekretierenden Zellen bestimmt wurde, nicht jedoch die sekretierte Proteinmenge quantifiziert werden konnte, schloss sich eine Bestimmung der IL-16-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA an (Abbildung 4c). Die mit Abstand stärkste Sekretion zeigte die Zelllinie NCI-H929. Sie wies eine IL-16-Konzentration von 440 pg/ml des Zellkulturüberstands auf. MOLP-8 (324 pg/ml), KMS-12-BM (278 pg/ml), AMO-1 (277 pg/ml), IM-9 (253 pg/ml) und RPMI-8226 (206 pg/ml) zeigten ebenfalls deutliche Mengen des sekretierten Cytokins im Zellkulturüberstand. EJM

(66 pg/ml), SK-007 (59 pg/ml) und U-266 (32 pg/ml) sezernierten dahingegen vergleichsweise wenig IL-16. Im Zellkulturüberstand von LP-1 war unter gegebenen Bedingungen kein IL-16 detektierbar. Wurde die relative Anzahl der IL-16-sezernierenden Zellen mit der sekretierten Cytokinmenge verglichen, so war eine signifikante Korrelation ersichtlich ($\rho = 0,775$; $R^2 = 0,601$; $p < 0,0001$)^b gleichwohl sich die Sekretionsstärke in einigen Zelllinien nicht mit ihrer SFU zu decken schien. Beispielsweise waren bei NCI-H929 nur 83 % der Zellen zu einer IL-16-Sekretion befähigt und die Zelllinie bildete dabei Rang 4 der Zellen mit hohem Anteil IL-16-sezernierender Zellen, jedoch entlässt es im Vergleich zu den anderen Zelllinien die größte Cytokinmenge. Genau umgekehrt erwies es sich bei IM-9. Die Zelllinie platzierte sich mit 93 % auf den vordersten Rang der IL-16-sezernierenden Zellen. Die Zelllinie sekretierte jedoch weniger als 2/3 der Cytokinmenge von NCI-H929. Demnach divergierte die Expressionsstärke der Zellen jeder einzelnen Zelllinie.

Die in den Sekretionsanalysen verwendeten Antikörper sind gegen das reife IL-16 (C-terminale Fragment) gerichtet, erkennen jedoch natürlich auch das Pro-IL-16. In Western Blot Analysen wurde daher geprüft, in welcher Form IL-16 von den Myelomzellen sekretiert wird. Die Bandendetektion in **Abbildung 4D** erfolgte mit jeweils unterschiedlichen Belichtungszeiten. Um dies zu kennzeichnen, wurde eine separierende Darstellung mittels grauer Boxen gewählt. Mit Ausnahme von LP-1 weisen alle Zelllinien sekretiertes, reifes IL-16 auf (**Abbildung 4D**).

Aus den drei verschiedenen Nachweismethoden geht hervor, dass alle Myelomzellen, die eine hohe IL-16-Genaktivität und starke IL-16-Proteinbiosyntheseraten zeigen, ebenfalls zur Sekretion des bioaktiven IL-16 befähigt sind.

3.1.2.2 Myelomzellen zeigen eine konstitutive Prozessierung des Vorläuferproteins zu bioaktivem Interleukin-16

Obwohl bei bisher analysierten Zellarten bekannt ist, dass die Prozessierung und Sekretion von Interleukin-16 erst nach einer Zellaktivierung stattfindet^{136,137,162,163,171,281}, konnte bei unveränderter Zusammensetzung des Zellkulturmediums und gleichbleibenden Kulturbedingungen bei den Myelomzellen bioaktives sekretiertes IL-16 im Mehrmethodenansatz nachgewiesen werden (siehe 3.1.2.1).

^b ermittelt über Pearson-Korrelation

Bisher gibt es keine Informationen, wie diese Mechanismen in malignen Plasmazellen organisiert sind. In den nachfolgenden Experimenten erfolgte daher die differenzierte Untersuchung der Prozessierung von Pro-IL-16 in den Myelomzellen.

In T-Zellen konnte beschrieben werden, dass eine Prozessierung des Pro-IL-16 durch aktivierte Caspase-3 erfolgt, dieser Prozessierungsverlauf jedoch nicht mit der Einleitung der Apoptose korreliert oder gar von der Apoptose abhängt.^{151,153} Anschließend wurde beschrieben, ob es sich im onkologischen Kontext am Modell des Multiplen Myeloms gleichermaßen verhält und wie eine konstitutive Spaltung des Vorläuferproteins gewährleistet wird. Dafür wurde zunächst untersucht, ob das von den Myelomzelllinien exprimierte Pro-IL-16 durch die Caspase-3 prozessierbar ist. Für diesen Versuch wurden Zelllysate von Myelomzellen mit rekombinanter Caspase-3 für 2 h inkubiert und die Entstehung des C-terminalen Fragments (reifes IL-16) im Immunoblot überprüft (**Abbildung 5B**). Bei der Auftragung der Proteinmenge wurde darauf geachtet, diese möglichst gering zu halten, um sicherzugehen, bei den unbehandelten Lysaten unter der Nachweisgrenze des reifen IL-16 zu bleiben. So wurde bei den Kontrollen ausschließlich das Vorläuferprotein detektiert, während nach Inkubation mit der rekombinanten Caspase-3 auch das C-terminale Fragment deutlich nachweisbar war, einhergehend mit einer leichten Reduktion der Menge an Pro-IL-16. Daraus ist abzuleiten, dass das Pro-IL-16 der Myelomzellen ein Substrat der Caspase-3 darstellt. Um sicherzustellen, dass es sich bei dem rekombinanten Protein um die reine und biologisch aktive Protease handelt, hatte zuvor die Validierung der Caspase-3 Aktivität an einem für sie spezifischen Substrat stattgefunden, wobei ein colorimetrisch detektierbares Spaltprodukt entstand. Um die Reinheit der rekombinanten Protease zu prüfen, wurde sie in einem weiteren Ansatz mit einem Caspase-3 spezifischen Inhibitor blockiert, in dem das farbige Spaltprodukt nicht mehr gebildet wurde (**Abbildung 5A**).

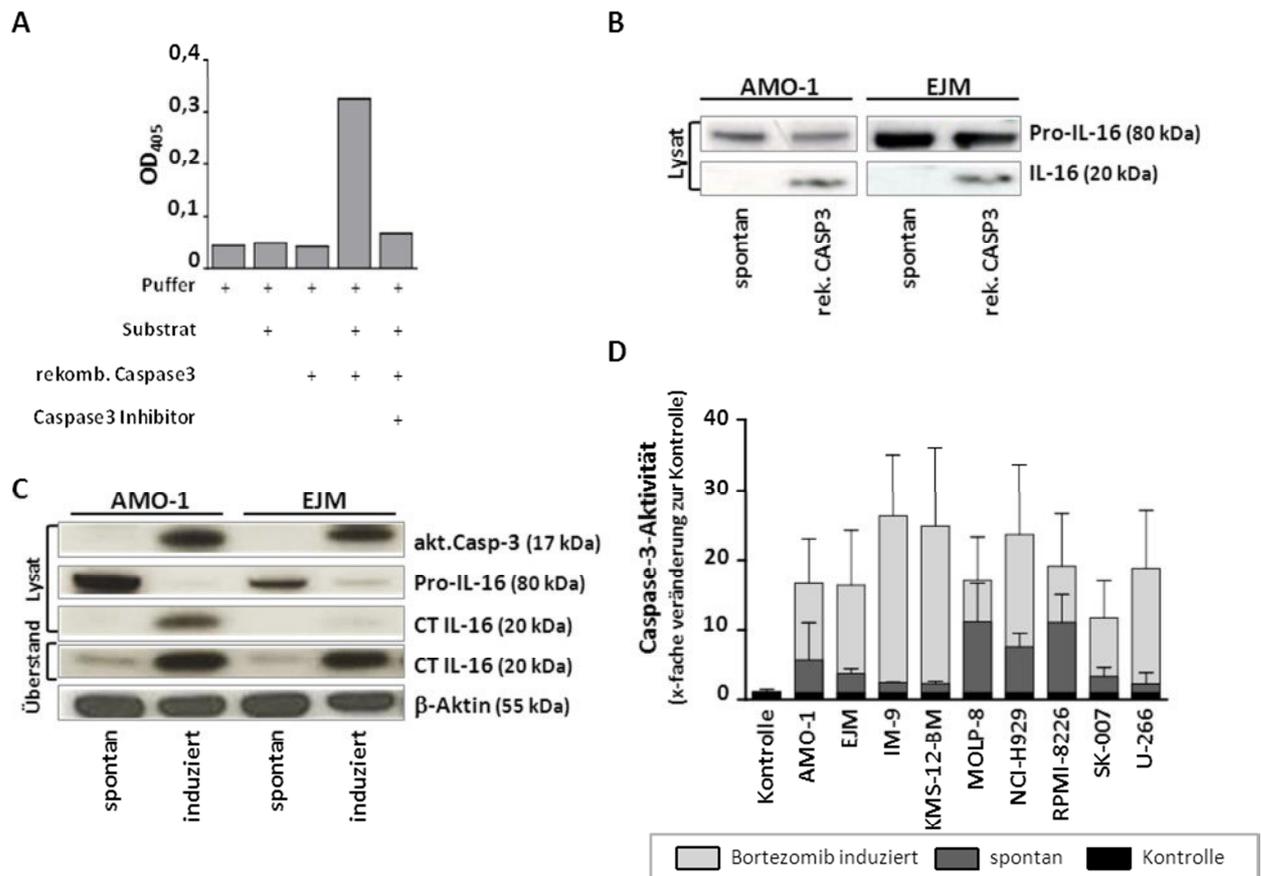


Abbildung 5: Prozessierung von Pro-Interleukin-16 zur bioaktiven Form

(A) Die verwendete rekombinante Caspase-3 wurde vor Verwendung auf Funktionalität und Reinheit geprüft. Für einen spektrophotometrisch detektierbaren Farbumschlag war die Spaltung des chromophorgekoppelten Caspase-3 Substrats DEVD-pNA verantwortlich. Als Inhibitor wurde DEVD-FMK verwendet. (B) Lysate von unbehandelten Myelomzellen wurden mit rekombinanter Caspase-3 inkubiert. Der Effekt wurde im Immunoblot nachgewiesen. (C) Zellkulturüberstände und Lysate von unbehandelten (spontan) sowie bortezomibbehandelten Zellen (25 nM; 6 h; induziert) wurden in einem Western Blot analysiert und verglichen. (D) Die spontane und induzierte, zelltodassoziierte Caspase-3 Aktivität von Myelomzellen wurde colorimetrisch durch Umsetzung des Substrates DEVD-pNA ermittelt. Als Kontrollzelllinie wurden HEK293T-Zellen verwendet. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Dargestellt sind die Mittelwerte (Höhe der Säulen) und die Standardabweichung (Fehlerbalken). Die drei Säulen einer Zelllinie befinden sich in überlagerter, nicht gestapelter Darstellung.

Weiterhin wurde untersucht, ob sich diese Spaltung auch in lebenden Zellen beobachten lässt und ob die prozessierte und sekretierte Menge an IL-16 mit der Caspase-3 Aktivität korreliert. Um diesen Aspekt zu beleuchten wurden Myelomzellen mit dem myelomspezifischen Chemotherapeutikum Bortezomib behandelt, das bei einer Konzentration von 25 nM innerhalb von 4-6 h zu einer merklichen Erhöhung der Caspase-3-Aktivität bei unveränderter Vitalität der Myelomzellen führte und ca. 24 h nach dessen Anwendung die Zellvitalität deutlich verschlechterte und letztlich das Zellsterben verursachte. Nach 6 h Inkubation mit Bortezomib wurden Kulturüberstände und Zelllysate der noch vitalen Zellen gewonnen und im Immunoblot auf die Präsenz von Pro-IL-16 und C-terminalen IL-16 untersucht (Abbildung 5C; repräsentativ für 9 verschiedene Zelllinien). Als Vergleich wurden unbehandelte Zellen verwendet,

bei denen die aktive Form der Caspase-3 (17 kDa) nicht detektierbar war, die hingegen bei Lysaten der bortezomibinduzierten Zellen sehr stark sichtbar war. Die Kontrollzellen zeigten jedoch eine deutliche Pro-IL-16-Bande (80 kDa), die nach Caspase-3 Aktivierung fast komplett verschwand, dahingegen aber die Menge an reifen IL-16 (20 kDa) merklich anstieg. Letzteres traf vor allem auf AMO-1 zu. Bei EJM nahm die intrazelluläre Menge an C-terminalen IL-16 nur in dem Maße zu, dass es mit der relativ insensitiven Methode detektiert werden konnte. Da aber eine effektive Spaltung des Vorläuferproteins stattfand (Reduktion des Pro-IL-16-Signals), könnte die unmittelbare Sekretion des reifen Cytokins eine Erklärung sein. Zwar war schon vor der Caspase-3 Aktivierung eine detektierbare Menge an prozessierten IL-16 im Kulturüberstand vorhanden, diese nahm nach Bortezomibbehandlung jedoch in beiden Zelllinien drastisch zu.

Diese Ergebnisse zeigten eine Korrelation zwischen der Caspase-3 Aktivität und der prozessierten IL-16-Menge auf und deuten darauf hin, dass, die Spaltung des Pro-IL-16 der Myelomzellen, vergleichbar zu den Ergebnissen mit normalen T-Lymphozyten, durch die Caspase-3 geschieht und sich darüberhinaus unmittelbar die Sezernierung des reifen Cytokins anzuschließen scheint.

Nun konnte trotz mangelnder Caspase-3 Detektion zum wiederholten Mal C-terminales IL-16 in den Kulturüberständen nachgewiesen werden (**Abbildung 5C spontan; Abbildung 4**). Um zu prüfen, ob die Myelomzellen eine latente Caspase-3 Aktivität besitzen, die durch den insensitiven Immunoblot nicht nachweisbar war, wurde ein sensitiveres Verfahren angewendet. Hierzu wurden die Zelllysate unbehandelter Zellen mit dem chromophoregelabelten Caspase-3 Substrat DEVD-pNA inkubiert. Durch die Spaltung des Substrats wurde ein colorimetrischer Umschlag herbeigeführt, der spektrophotometrisch erfasst wurde. Dieser Test hat ergeben, dass alle getesteten Myelomzellen eine intrinsische, spontane Caspase-3 Aktivität besitzen (**Abbildung 5D; dunkelgraue Säulen**). Die spontane Aktivität war gegenüber den Referenzzellen mindestens doppelt so hoch (IM-9, KMS-12BM). Manche Zellen zeigten aber auch eine elffach stärkere, spontane Aktivität (MOLP-8, RPMI-8226). Diese Caspase-3 Aktivitätslevel waren nicht apoptoseassoziiert. Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Lysatherstellung viabel. Zeitgleich wurde der Versuch mit Zellen durchgeführt, die 16 h mit Bortezomib inkubiert wurden, um einen Vergleich zwischen spontaner und apoptoseassoziiertem Caspase-3 Aktivität zu erhalten. Die Inkubationszeit von 16 h wurde so gewählt, damit die Zellen zwar noch nicht tot waren, der Mechanismus für die Apoptose aber

schon stark aktiviert war. Die Schwellenwerte, die bei den Myelomzellen in der Einleitung der Apoptose münden, liegen deutlich höher, als die spontan erfassten Caspase-3 Aktivitäten (**Abbildung 5D; hellgraue Säulen**). Bei einigen Zelllinien ist die induzierte Aktivität um das zehnfache erhöht (IM-9, KMS-12BM), bei anderen nur um das 1,5 - 2-fache (MOLP-8, RPMI-8226).

Aus den Analysen lässt sich ableiten, dass die konstitutive Prozessierung von Pro-IL-16 möglicherweise auf die spontane Caspase-3 Aktivität zurückzuführen ist und diese entkoppelt vom programmierten Zelltod verläuft.

3.2 Identifizierung des Einflusses von Interleukin-16 auf die biologischen Prozesse der Myelomzellen

Derart auffällige Expressionsmuster und energieaufwendige Expressionsregulationen, wie sie im vorherigen Abschnitt beschrieben wurden, lassen auf einen für die Pathogenese der malignen Plasmazelle relevanten Einfluss von IL-16 schließen. Dieser Abschnitt der Arbeit widmete sich daher der Erforschung der funktionellen Bedeutung von IL-16 im malignen Phänotyp des Multiplen Myeloms. Häufig basierten die angeführten Experimente auf einem Vergleich von Zellen mit artifiziell herunterregulierter IL-16-Expression und den entsprechenden Kontrollzellen, in denen die IL-16-Expression nicht beeinträchtigt war. Zunächst wird demgemäß die Validierung des Untersuchungssystems angeführt, dem die funktionellen Analysen nachgestellt sind.

3.2.1 Validierung der shRNAmir-vermittelten Herunterregulierung der IL-16-Expression

Um die Proteinbiosynthese von IL-16 zu unterbinden, wurde mithilfe von shRNA-vermittelter Interferenz ein Abbau der IL-16-mRNA herbeigeführt. Zunächst wurden viele verschiedene Systeme ausgetestet, um einen verlässlichen Knockdown zu erzeugen. Darunter waren beispielsweise pLKO.1-Modelle für stabile oder IPTG-induzierbare shRNA-Expression^{282,283}. Insgesamt wurden 14 verschiedene shRNA-Sequenzen in das Expressionssystem pLKO.1 kloniert und lentiviral verpackt. Die anschließend transduzierten Myelomzellen wurden auf ihre IL-16-Expression getestet, jedoch konnte mit keinem der Konstrukte der gewünschte Knockdown erzielt werden. Die Zellen, die mit den induzierbaren Konstrukten transduziert wurden, ließen sich gut zu einer homogenen, infizierten Zellkultur etablieren. Die induzierten Knockdown-Effizienzen der verschiedenen Konstrukte erreichten jedoch maximal 30 %, darunter einige, bei denen keinerlei Veränderung der IL-16-mRNA detektiert werden konnte

(Daten nicht gezeigt). Da der Expressionsvektor für kein Reporter gen kodiert, konnte nicht validiert werden, ob die mangelnde Effizienz auf ungeeignete shRNA-Sequenzen oder mangelnder shRNA-Expression zurückzuführen war. Bei der Austestung der Vektoren, die auf einer permanenten shRNA Expression basierten, konnten die Myelomzellen nicht effizient transduziert werden. Bei der sich anschließenden langen Phase der Zellselektion infizierter Zellen konnte keine viable Kultur etabliert werden. Die zwischenzeitige Überprüfungen der Knockdown-Effizienz lieferte ebenfalls keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Eine Validierung der Ursache wurde auch hier erschwert. Möglicherweise war der Aufbau des pLKO.1-Vektorsystems (gewählte Elemente, Anordnung der Elemente) nicht optimal für Myelomzellen geeignet. Hinzu kam das stark aktivierte, komplexe Expressionsmuster von IL-16.

Als Alternative wurde das TRIPZ-System²⁷⁰ ausgetestet. Es überzeugte durch die Kombination von induzierbarer shRNAmir-Expression, der Expressionsverfolgung durch ein Reporter gen und zuverlässige Knockdown-Effizienzen bei anderen getesteten Genen.^{284–288} Innerhalb des Systems wurden vier Vektoren getestet, die jeweils für eine IL-16-spezifische shRNAmir Sequenz kodierten (shRNA1-4). Außerdem wurde ein fünfter Vektor als Negativkontrolle angewandt, der lediglich eine shRNAmir Sequenz unspezifischen Ziels trug. Im Folgenden werden die Ergebnisse der technischen Validierung beschrieben.

3.2.1.1 Myelomzellen eignen sich zur effizienten lentiviralen Transduktion

Nach erfolgreicher Virusproduktion und Titerbestimmung der einzelnen virusenthaltenden Überstände erfolgte eine Ermittlung der Transduktionseffizienz der Myelomzelllinien AMO-1 und RPMI-8226. Dabei wurde sichergestellt, dass der zur Virusverpackung gewählte Pseudotyp (siehe Kapitel 2.2.6) zur Infektion dieser Zellen geeignet ist, da dies die Voraussetzung der stabilen Integration des Vektorplasmids in das Genom der Zielzelle darstellt. Durch die Expression des Reporter gens konnte die Transduktionseffizienz sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch durchflusszytometrisch bestimmt werden (Abbildung 6). Dargestellt sind die Effizienzen unter der Verwendung unterschiedlicher MOIs sowohl für ein repräsentatives Beispiel eines Viruspartikels mit der Information für eine IL-16-spezifische shRNAmir als auch für die Negativkontrolle. Alle Konstrukte ähnelten sich stark und wiesen bei einer MOI 1 eine durchschnittliche Transduktionseffizienz von ca. 50 % auf. Bei einer MOI 5 erhöhte sich der relative Anteil infizierter Zellen auf ca. 85 % und stieg durch eine Verdopplung der infektiösen Partikel pro Zelle lediglich um durchschnittlich ca. 3 %-Punkte (Abbildung 6A).

Die **Abbildung 6B** beschreibt, auf welche Weise die durchflusszytometrische Effizienzbestimmung erfolgte. Als Richtwert für RFP-negative Zellen wurden nicht transduzierte Zellen der jeweiligen Zelllinie eingesetzt (hellgrau), anhand derer die Eingrenzung der RFP-positiven Zellen erfolgte (dunkelgrau).

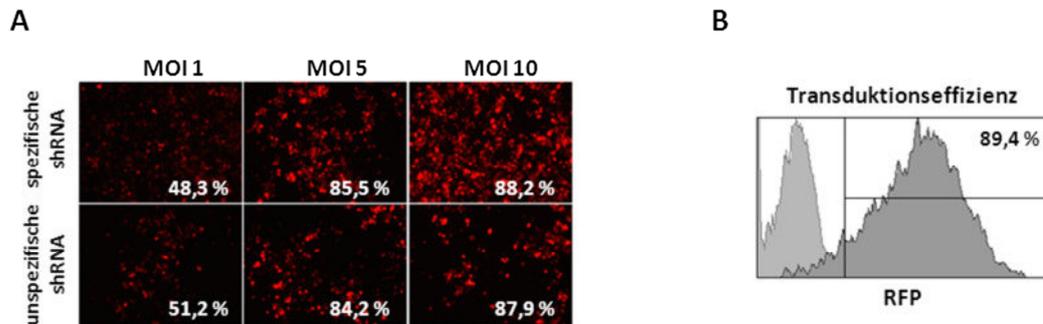


Abbildung 6: Ermittlung der Transduktionseffizienz von Myelomzelllinien

Die Transduktionseffizienz der Myelomzelllinien wurde mittels Reporter (RFP) (A) am Fluoreszenzmikroskop gesichtet und (B) durchflusszytometrisch bestimmt (hellgrau: nicht transduzierte Zellen, dunkelgrau transduzierte Zellen). (A) Dargestellt ist ein Beispiel von RPMI-8226 Zellen, die mit shRNA1 (oben) bzw. der Negativkontrolle transduziert wurden. Für die Transduktion mit den anderen shRNAmir-Sequenzen bzw. der Transduktion von AMO-1 ergab sich ein fast identisches Bild. Die prozentualen Angaben entsprechen den durchschnittlich ermittelten Transduktionseffizienzen (zwei unabhängige Wiederholungen).

Aufgrund der hohen Transduktionsraten ist eine Mehrfachinfektion bei allen drei getesteten MOIs möglich und bei MOI 5 sowie MOI 10 sehr wahrscheinlich. Dies ist auch an der zunehmenden Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen sichtbar. Für die nachfolgende Validierung der Knockdown-Effizienz wurden die Zielzellen mit einer MOI 5 und MOI 10 infiziert. Der Grund dafür lag in der unzulänglichen Knockdown-Effizienz zuvor getesteter Systeme und dem Aspekt, dass multiple Kopien der shRNAmir im Zielzellgenom zu einer stärkeren Herunterregulation des Gens führen.^{289,290}

3.2.1.2 Der shRNAmir-vermittelte Interleukin-16-Knockdown erreicht hohe Effizienzen

Obwohl es sich bei den kommerziell erworbenen, gegen IL-16-mRNA gerichteten shRNAmir-Sequenzen um geprüfte Systeme handelt, wurde erneut untersucht, ob die verschiedenen Sequenzen einen hinreichenden Knockdown herbeiführen. Durch die Integration des Vektorplasmids trugen die transduzierten Zellen ein Puromycinresistenzgen. Durch den Zusatz des Antibiotikums zum Zellkulturmedium wurden diese Zellen selektiert und es bildete sich innerhalb einer Woche eine homogene Kultur transduzierter Zellen heraus.

Überprüft wurde jenes mittels durchflusszytometrischer Analyse zur Detektion des Reportergens.

Der Nachweis der IL-16-Expression erfolgte zunächst mittels q-RT-PCR an Tag 4 der shRNAmir Induktion (**Abbildung 7A**). Im Vergleich zur Negativkontrolle verursachte die shRNA2 sowohl bei einer MOI 5 als auch bei einer MOI 10 die stärkste Reduktion der IL-16-mRNA Level, gefolgt von der shRNA1. Auch die shRNA3 führt bei einer MOI 5 und MOI 10 zur signifikanten Herunterregulierung der IL-16-mRNA. Mit der shRNA4 konnte dieser Effekt nicht erzielt werden. Im Umkehrschluss konnte der Grad der Herunterregulierung durch eine Knockdown-Effizienz ausgedrückt werden, die sich relativ zu den Expressionslevel der Negativkontrolle berechnet. Die Wahl einer prozentualen Angabe für die Beschreibung des Knockdowns gewährleistet eine bessere Vergleichbarkeit verschiedener Konstrukte. Mit der shRNA2 konnte eine durchschnittliche Knockdown-Effizienz von 96 % (MOI 5) und 98 % (MOI 10) erzielt werden. Die Induktion der shRNA1 führte zu einer 61 %igen (MOI 5) bzw. 71 %igen (MOI 10) Verminderung der IL-16-Expression. Im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle (MOI 5 und MOI 10) erzielte die shRNA3 eine Knockdown-Effizienz von 60 %. Bei der shRNA4 lag diese bei 41 % (MOI 5) bzw. 43 % (MOI 10) (**Abbildung 7B**).

Aufgrund verschiedenster posttranskriptioneller Regulationen korreliert die Proteinexpression häufig nicht mit den entsprechenden mRNA-Level^{291,292} und muss im Zuge der Bestimmung der Knockdown-Effizienz ebenfalls untersucht werden. **Abbildung 7C** zeigt einen Immunoblot, bei dem die intrazelluläre Expression von Pro-IL-16 an Tag 4 nach Induktion der shRNAmir Expression nachgewiesen wurde. Hier ist schon deutlich zu erkennen, dass die shRNA2 einen starken Knockdown herbeiführte. Bei den anderen Sequenzen ist noch immer eine distinkte Bande sichtbar. Die Effizienz des Verlustes des IL-16-Proteins wurde densitometrisch anhand der Immunoblotbanden ermittelt (**Abbildung 7**). Identisch zur mRNA Expression führte die shRNA2 sowohl bei MOI 5 als auch bei MOI 10 zur stärksten Knockdown-Effizienz von 98,8 % (MOI 5) und 96,9 % (MOI10). Mit der shRNA1 wurde eine Reduktion der IL-16-Expression von 82,7 % (MOI 5) und 64,4 % (MOI10) erreicht. Ebenso wie bei den Transkriptleveln erreichten die shRNA3 und shRNA4 keine zufriedenstellende Herunterregulation. Nach Anwendung der shRNA3 wurde die IL-16-Expression um ca. 45 % (48,4 % bei MOI 5, 41,4 % bei MOI 10) gesenkt, bei der shRNA4 waren es nur ca. 15 – 20 %.

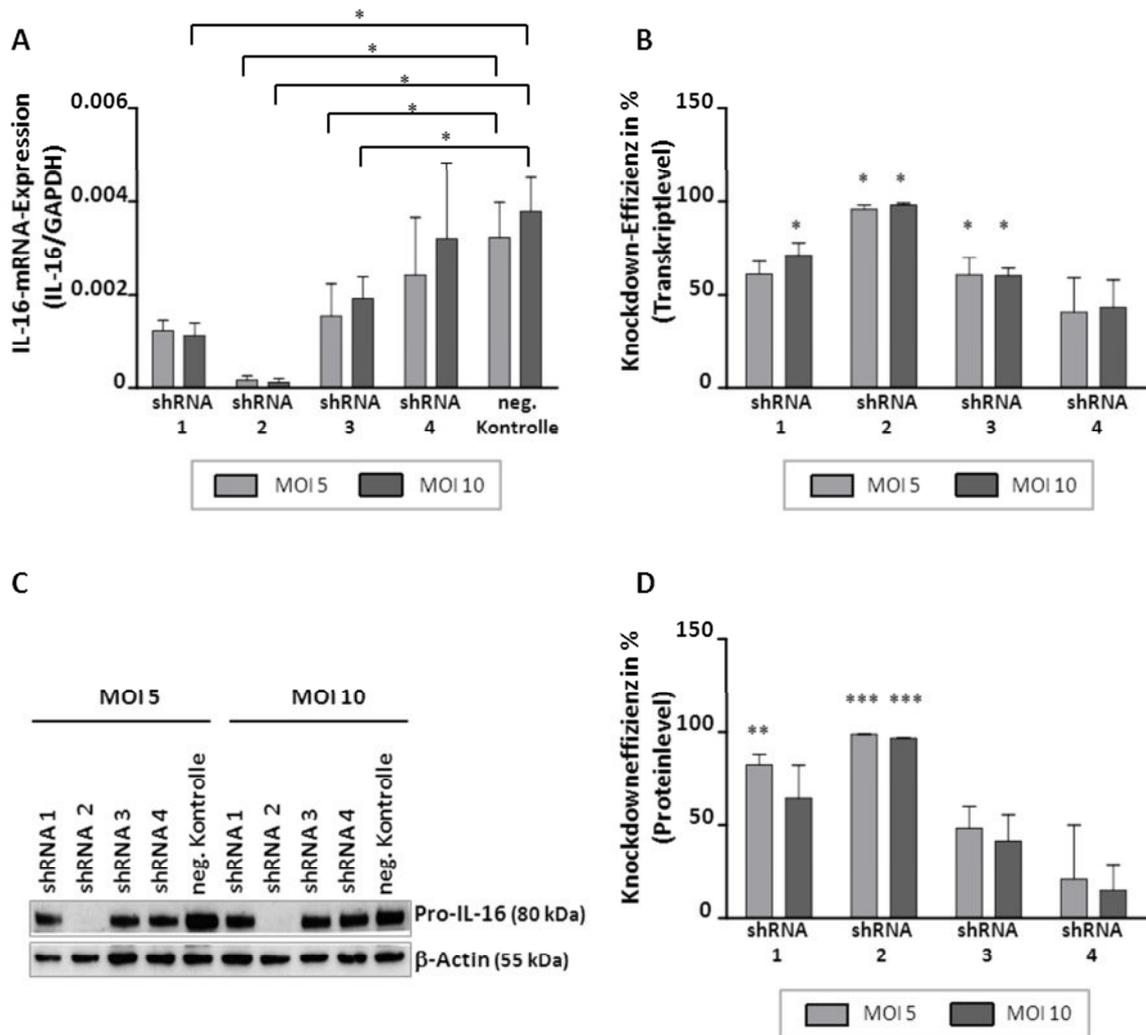


Abbildung 7: Überprüfung der Interleukin-16-Knockdown-Effizienz

(A) Die relativen IL-16-mRNA Level wurden mittels q-RT-PCR ermittelt. Sie wurden zur Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse spiegeln die Mittelwerte (Säulen) und Standardabweichungen (Fehlerbalken) aus drei unabhängigen Wiederholungen wieder. Ein gepaarter t-Test wurde angewendet, um das Signifikanzniveau der Veränderung der Transkriptlevel im Vergleich zur Negativkontrolle zu bestimmen. shRNA1 (MOI10): $p = 0,0255$; shRNA2 (MOI 5): $p = 0,0187$; shRNA2 (MOI10): $p = 0,0104$; shRNA3 (MOI 5): $p = 0,00181$; shRNA3 (MOI 10): $p = 0,00318$. (B) Dargestellt ist die Knockdown-Effizienz der IL-16-mRNA Expression in Relation zur Negativkontrolle. Sie ergab sich aus einer Transformation der in (A) detektierten Expressionslevel. (C) Überprüfung der intrazellulären IL-16-Expression mittels Western Blot. (D) Densitometrische Ermittlung der Knockdown-Effizienz auf Proteinebene gegenüber der Negativkontrolle als Referenz. Analog zu (A) wurde ein gepaarter t-Test zur Signifikanzbestimmung der Veränderung der Proteinlevel im Vergleich zur Negativkontrolle angewendet. shRNA1 (MOI5): $p = 0,0045$; shRNA2 (MOI 5): $p < 0,0001$; shRNA2 (MOI10): $p < 0,0001$

Aus den Analysen ging hervor, dass lediglich die shRNAmir-Sequenz 2 einen verlässlichen Knockdown erzeugt. Es machte dabei keinen Unterschied, ob die Zellen mit einer MOI 5 oder MOI 10 infiziert wurden. Für die Verifizierung des Einflusses von IL-16 auf verschiedene funktionelle Systeme innerhalb der Myelomzelle wurde daher diese Sequenz 2 für den shRNAmir-vermittelten Knockdown verwendet.

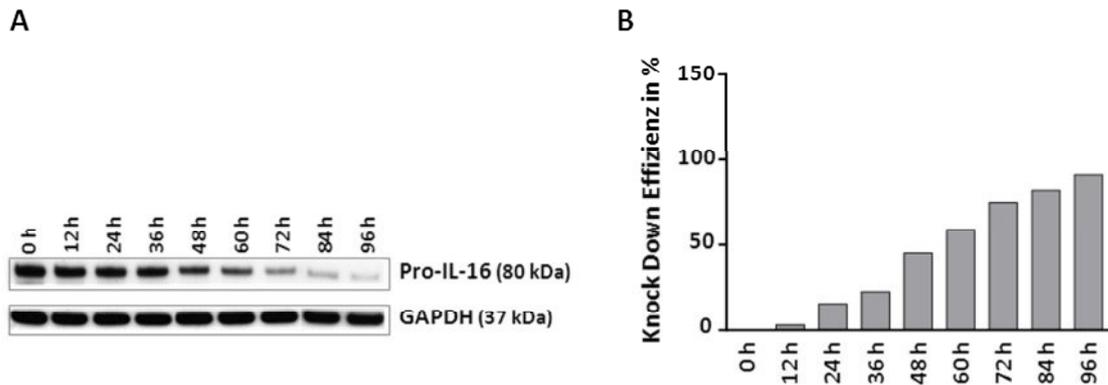


Abbildung 8: Kinetik des shRNAmir-vermittelten Interleukin-16-Knockdown

Das Zellkulturmedium der lentiviral transduzierten Zellen wurde zum Zeitpunkt 0 h mit Doxycyclin versetzt. Jenes induziert die Expression der shRNAmir, was den IL-16-Knockdown zur Folge hat. Alle 12 h wurden Zellen der Kultur entnommen und ihre IL-16-Expression überprüft. (A) Western Blot Analyse zur Nachweis der intrazellulären IL-16-Expression. (B) Dargestellte Knockdown-Effizienz wurde durch die densitometrische Ermittlung der relativen IL-16-Proteinexpression kalkuliert.

Da es geplant war, einige der später angeführten funktionellen Tests in Form einer Kinetik abzubilden, wurde zunächst die schrittweise Reduktion der Proteinmenge bis zum zuvor nachgewiesenen Knockdown an Tag 4 beobachtet. So konnte in den späteren Versuchen abgeschätzt werden, ob schon eine anteilige Reduktion der IL-16-Proteinmenge einen funktionellen Einfluss nimmt. In Western Blot Analysen konnte eine sukzessive Abnahme der intrazellulären IL-16-Proteinmenge aufgezeichnet werden (**Abbildung 8A**). Die Menge des Referenzproteins GAPDH blieb dabei konstant. Durch die densitometrische Erfassung der verbleibenden IL-16-Menge konnte die Knockdown-Effizienz erfasst werden. Nach ca. 55 h hatte eine Halbierung der IL-16-Proteinmenge stattgefunden. Die stärkste Reduktion wurde erst an Tag 4 erreicht (**Abbildung 8B**).

3.2.2 Die Auswirkung von Interleukin-16 auf die Genexpressionsprofile von Myelomzellen

In einer genomweiten Expressionsanalyse wurden die Genaktivitäten von IL-16-positiven und artifiziell IL-16-negativen Myelomzellen verglichen, um Effekte ableiten zu können, die möglicherweise aus dem Mangel an IL-16 hervorgegangen sind. Die Analysen wurden an zwei verschiedenen Myelomzelllinien, AMO-1 und RPMI-8226, durchgeführt. Das IL-16-Expressions- und Sekretionsprofil beider Zelllinien ähnelte sich sehr stark (**Abbildung 2**, **Abbildung 4**). Mithilfe einer Microarray-Analyse wurde pro Zelllinie das Genexpressionsprofil dreier verschiedener Proben IL-16-negativer Zellen sowie dreier verschiedener Kontrollen IL-16-positiver Zellen erstellt. Der IL-16-Knockdown in den Versuchszellen erfolgte über den

shRNAmir vermittelten Abbau der mRNA. Dafür wurden die Zellen mit den shRNA2-Viruspartikeln und einer MOI 10 infiziert. Die Kontrollzellen wurden mit Viruspartikeln der unspezifischen shRNAmir-Sequenz und der selbigen MOI transduziert.

3.2.2.1 Interleukin-16 reguliert differenziell die Genexpression in Myelomzellen

Nach sorgfältiger biostatistischer Auswertung (siehe 2.3.6.2) und Selektion nach eng gefassten Signifikanzkriterien zur Eingrenzung der Gefahr der Benennung falsch positiver Kandidaten konnten in beiden Zelllinien differenziell regulierte Gene identifiziert werden (Tabelle 8). Auffällig war, dass AMO-1 deutlich sensibler auf die Abwesenheit von IL-16 reagierte, als es bei RPMI-8226 zu beobachten war.

Tabelle 8: Signifikant modulierte Genexpression bei IL-16-negativen Zellen

Paarweise Transkriptexpression	SLR \leq -0,4	SLR \geq 0,4
AMO-1 (IL-16-Knockdown vs. IL-16 Wildtyp)	253	333
RPMI-8226 (IL-16-Knockdown vs. IL-16 Wildtyp)	47	32

Ein *Signal-Log-Ratio* (SLR) \leq -0,4 für herabregulierte Gene, bzw. \geq 0,4 für hochregulierte Gene wurden als Schwellenwerte gewählt, um Gene zu identifizieren, deren Expression signifikant ($p = 0,01$) moduliert wurde.

Der Verlust der IL-16-Expression führte bei AMO-1 zur signifikanten Veränderung des Expressionsprofils von 586 Transkripten. Darunter waren 253 Transkripte in den IL-16-negativen Zellen herunterreguliert und 333 Transkripte stärker exprimiert als in der entsprechenden Kontrolle IL-16-positiver Zellen. Bei RPMI-8226 zog der IL-16-Knockdown eine signifikant modulierte Expression von 79 Transkripten nach sich, davon 47 schwächer und 32 stärker exprimiert als in den Kontrollzellen. Damit reagierten die Zellen dieser Zelllinie wesentlich insensibler auf den Verlust von IL-16, jedenfalls hinblickend ihrer Genexpressionsmodulation. Überlappungen der modulierten Gene beider Zelllinien gab es nicht.

Anhand der differenziell regulierten Gene wurde eine Clusteranalyse der verwendeten Zellen erstellt. In der Clusteranalyse wurden die regulierten Transkriptvarianten eines Gens kondensiert betrachtet. Über die Distanzermittlung bzgl. der Genexpressionsmuster wurde der Ähnlichkeitsgrad der eingesetzten Proben ermittelt und visuell veranschaulicht. In Form einer farblichen Darstellung des medianzentrierten Expressionssignals wurde die Stärke der

jeweiligen Genregulierung ausgedrückt. Aus der Clusteranalyse geht hervor, dass sich die Expressionsprofile der IL-16-negativen Zellen am ähnlichsten sind und daher in einer Subgruppierung zusammengefasst werden, die sich von den Expressionsprofilen der IL-16-positiven Zellen abgrenzt. Dies gilt für die differenzielle Genaktivität in AMO-1 (**Abbildung 9A**) und RPMI-8226 (**Abbildung 9B**) gleichermaßen. Anhand der unterschiedlichen Farbgebung sind teilweise deutliche Unterschiede in der Regulationseffektivität eines Gens innerhalb der Triplikate der Knockdown-Gruppe erkennbar. Dies unterstreicht die Sensitivität der Micrarraysanalyse sowie die Notwendigkeit einer anschließenden funktionellen Validierung der Ergebnisse.

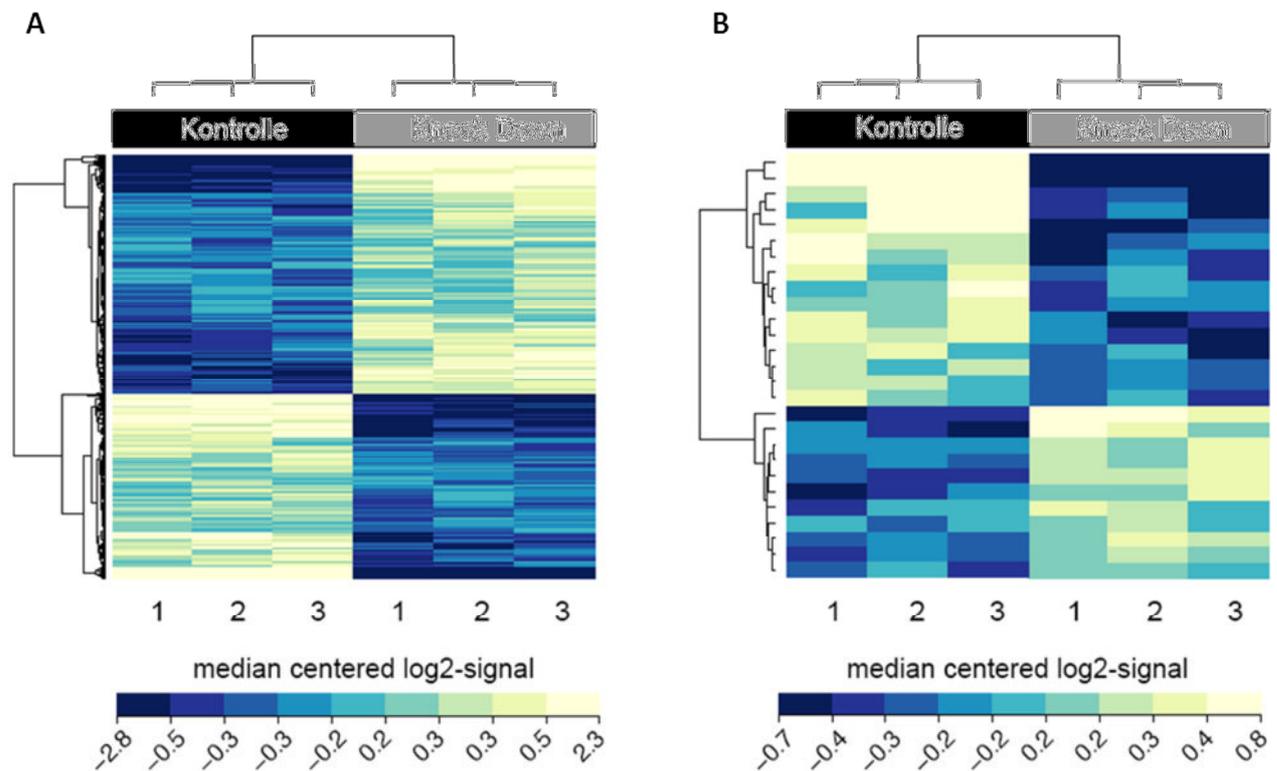


Abbildung 9: Clusteranalyse differenziell regulierter Gene nach Interleukin-16-Knockdown

Dargestellt sind die medianzentrierten Expressionsniveaus von den Genen, die infolge des IL-16-Knockdowns in den Myelomzelllinien AMO-1 (A) und RPMI-8226 (B) differenziell reguliert wurden. Anhand der Expressionsmuster wurde der Verwandtschaftsgrad aller analysierten Proben ermittelt, der durch das horizontal dargestellte Dendrogramm abgebildet wird. Das vertikale Dendrogramm gruppiert die regulierten Gene nach ihrer funktionellen Nähe. Die hierarchische Zuordnung erfolgte durch die Pearson Korrelation als Distanzmaß und der durchschnittlichen Linkage Methode.

3.2.2.2 Interleukin-16 beeinflusst potentiell die Proliferation, Viabilität, Apoptose und Differenzierung von Myelomzellen

Weiterhin wurde eine Identifizierung der funktionellen Bedeutung von Interleukin-16 anhand der erhobenen Genexpressionsdaten angestrebt. Die Analyse der Daten mithilfe der Ingenuity-Software ermöglichte eine allgemeine genontologische Zuordnung der regulierten Gene. Die strukturierte Einordnung des Datensatzes in biologisch funktionelle Prozesse basiert bei der Software auf unterschiedlichen Systemen. Als eine sehr wichtige Komponente greift die Software auf die Ressourcen der Datenbank „Gen Ontology“ zu. Diese Datenbank wird kontinuierlich durch das Gene Ontology Konsortium gepflegt und erweitert und enthält umfassende Informationen von Genprodukten bzgl. ihrer molekularen Funktion, Lokalisation sowie Einbindung in biologische Prozesse.²⁹³ Weitere Informationsquellen für die Interpretation der Expressionsdaten durch diese Software liefern verschiedene, sogenannte Genset Anreicherungsanalysen und Publikationsdatenbanken. Das Programm ist zudem in der Lage, doppelte Negationen von Expressionsregulationen zu berücksichtigen. Somit werden die Aktualität, Komplexität und Vollumfänglichkeit der verarbeiteten Informationen sichergestellt. Während der Identifikation differenziell regulierter Genkandidaten wurden streng gefasste statistische Kriterien gesetzt, um das Ausmaß des Einflusses von IL-16 nicht zu überschätzen. Da die Ableitung des funktionellen Effekts eines Gens jedoch ein gewisses Maß an Datenanreicherung verlangt, wurden auch regulierte Gene eines herabgesetzten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,1$) zur Einbettung in das Gesamtkonzept in die Auswertung mit einbezogen. Im Vordergrund stand dabei, eine Tendenz abzuleiten, die später verifiziert werden sollte.

Die **Tabelle 9** und **Tabelle 10** geben einen Überblick über die Ergebnisse der Zugehörigkeitsanalyse zu biologischen Prozessen. Diese Kategorien wurden von der Ingenuity-Software vorgeschlagen und sind mit den GO-Terms vergleichbar, nicht aber identisch. Sie gingen aus verschiedenen hierarchischen Ebenen hervor, und sind entsprechend ihrer Detailtiefe der Nomenklatur entweder wenig präzise, aber umfassend (z. B. Zellproliferation) oder sehr präzise, aber weniger umfangreich (z.B. Proliferation von Myelomzelllinien). Aus den Tendenzen der einzelnen funktionellen Kategorien lassen sich biologische Effekte von IL-16 zusammenfassen.

Tabelle 9: Biologische Effekte durch Herunterregulation von Interleukin-16 in AMO-1

Biologische Effekte / modulierte biologische Prozesse	Anzahl regulierter Gene	Z-Score	p-Wert
<i>Inaktivierte Proliferation</i>			
Anzahl der pre-B-Lymphozyten	14	-3,07	$2,22 \times 10^{-2}$
Anzahl der B-Lymphozyten	38	-1,454	$3,69 \times 10^{-3}$
Zellproliferation	60	-1,081	$2,78 \times 10^{-6}$
Anzahl der folliculären B-Lymphozyten	8	-0,842	$9,70 \times 10^{-3}$
Proliferation von Tumorzellen	26	-0,824	$9,01 \times 10^{-3}$
Proliferation von B-Lymphozyten	39	-0,782	$3,08 \times 10^{-5}$
Proliferation von Leukämiezelllinien	21	-0,771	$2,59 \times 10^{-2}$
Proliferation von Myelomzelllinien	6	-0,555	$4,97 \times 10^{-2}$
<i>Herabgesetzte Viabilität</i>			
Zellviabilität von B-Lymphozyten	11	-0,91	$2,73 \times 10^{-2}$
Zellviabilität	21	-0,239	$1,60 \times 10^{-2}$
<i>Reduziertes Zellsterben</i>			
Nekrose	53	-1,718	$7,80 \times 10^{-5}$
Apoptose	40	-1,722	$4,40 \times 10^{-3}$
Zelltod	54	-1,692	$6,51 \times 10^{-5}$
Zelltod von B-Lymphozyten	16	-1,692	$1,23 \times 10^{-2}$
Zelltod von Tumorzelllinien	37	-1,381	$6,10 \times 10^{-3}$
Apoptose von B-Lymphozyten	15	-1,211	$1,37 \times 10^{-2}$
Apoptose von Leukämiezelllinien	28	-0,751	$2,43 \times 10^{-2}$
Zelltod von Leukämiezelllinien	34	-0,64	$6,09 \times 10^{-3}$
<i>Förderung der Zelldifferenzierung</i>			
Differenzierung von Zellen	39	1,633	$5,11 \times 10^{-4}$
Differenzierung von Leukocyten	29	1,56	$3,41 \times 10^{-4}$
Differenzierung mononuklearer Leukozyten	28	1,318	$3,19 \times 10^{-4}$
Differenzierung von B-Lymphozyten	27	1,111	$5,26 \times 10^{-4}$

Signifikante Assoziation von differenziell regulierten Genen mit einer funktionellen Annotation bzw. mit einem bestimmten biologischen Prozess. Die funktionelle Gruppierung erfolgte mithilfe der Ingenuity-Software. In die Analyse einbezogen wurden regulierte Gene mit einem SLR $\leq -0,4$ bzw. SLR $\geq 0,4$ und einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,1$. Der in der Tabelle angegebene p-Wert ist ein Maß für die Verlässlichkeit des dargestellten Ergebnisses. Abgeleitet wird dieser p-Wert aus dem Überlappungsbereich von regulierten Genen und dem Genpool einer Kategorie. Der Z-Score gibt die Tendenz und die Stärke der Regulierung eines biologischen Prozesses an.

Es ist darauf zu achten, dass die in den **Tabelle 9** und **Tabelle 10** aufgeführten Effekte aus den Beobachtungen der IL-16-Knockdown Zellen stammen, d. h. in IL-16-negativen Zellen wurde

eine Reduktion/Aktivierung eines funktionellen Systems erfasst. Demnach wäre die tatsächliche biologische Funktion von IL-16 in Myelomzellen genau die Entgegengesetzte. Bei der Myelomzelllinie AMO-1 (Tabelle 9) konnte aus den Expressionsprofilen der IL-16-negativen Zellen eine verminderte proliferative Aktivität im Vergleich zu IL-16-positiven Zellen abgeleitet werden. Getragen wurde die Aussage von acht verschiedenen Kategorien biologischer Prozesse, die allesamt durch den Knockdown inaktiviert waren (negatives Zeichen des Z-Scores). Innerhalb einer Effektgruppe sind die biologischen Prozesse in absteigender Regulationstärke aufgelistet (Betrag des Z-Scores; stellt keinen Multiplikator dar). Die Inaktivierung zweier funktioneller Kategorien deutete darauf hin, dass neben der Proliferation auch die Viabilität der Zellen durch den Entzug der IL-16 Expression negativ beeinträchtigt worden ist. Weiterhin leitete die herabgesetzte IL-16-Expression eine Reduktion des Zellsterbens sowie eine Aktivierung der Zelldifferenzierung ein. Die Hemmung acht verschiedener, zelltodassoziiertes Prozesse bzw. die Stimulation vier verschiedener Prozesse der Zelldifferenzierung formierten dieses Postulat.

Tabelle 10: Biologische Effekte durch Herunterregulation von Interleukin-16 in RPMI-8226

Biologische Effekte / modulierte biologische Prozesse	Anzahl regulierter Gene	Z-Score	p-Wert
<i>Inaktivierte Proliferation</i>			
Zellproliferation	16	-1,555	$5,43 \times 10^{-3}$
Proliferation von B-Lymphozyten	10	-1,082	$2,09 \times 10^{-2}$
Anzahl der folliculären B-Lymphozyten	4	-0,152	$6,00 \times 10^{-3}$
<i>Reduziertes Zellsterben</i>			
Nekrose	14	-0,035	$1,75 \times 10^{-2}$

Signifikante Assoziation von differenziell regulierten Genen mit einer funktionellen Annotation bzw. mit einem bestimmten biologischen Prozess. Die funktionelle Gruppierung erfolgte mithilfe der Ingenuity-Software. In die Analyse einbezogen wurden regulierte Gene mit einem SLR $\leq -0,4$ bzw. SLR $\geq 0,4$ und einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,1$. Der in der Tabelle angegebene p-Wert ist ein Maß für die Verlässlichkeit des dargestellten Ergebnisses. Abgeleitet wird dieser p-Wert aus dem Überlappungsbereich von regulierten Genen und dem Genpool einer Kategorie. Der Z-Score gibt die Tendenz und die Stärke der Regulierung an.

Wie auch schon bei der Identifizierung differenziell regulierter Gene festgestellt werden konnte, reagierte die Myelomzelllinie RPMI-8226 wesentlich insensibler auf den Verlust der IL-16-Expression. Jenes spiegelte sich auch in der Herleitung der biologischen Effekte wieder (Tabelle 10). Insgesamt konnten für vier verschiedene Kategorien verlässliche Modifikationen erfasst werden. Interessanterweise ist unter der relativen Anzahl betroffener Systeme

wiedermals die Proliferation veretreteten, denn insgesamt drei von den modulierten Kategorien unterstützen die These, der Verlust von IL-16 führe zur Hemmung der Proliferation. Die vierte Kategorie war der biologische Prozess Nekrose. Wie auch schon bei AMO-1 ist er bei RPMI-8226 inaktiviert und fällt damit in die Effektgruppe des reduzierten Zellsterbens.

Insgesamt lässt sich aus den Microarrayanalysen festhalten, dass der Verlust von IL-16 das Genexpressionsprofil von Myelomzellen in unterschiedlicher qualitativer sowie quantitativer Ausprägung beeinflusst. Die aggressivere Form des Multiplen Myeloms, das Plasmozytom, reagiert sensitiver auf den Verlust der IL-16-Expression. In beiden getesteten Zelllinien ließ sich eindeutig ein proliferationsfördernder Beitrag von IL-16 ableiten. Weitere Tendenzen waren die Verstärkung des Zellsterbens, sowie eine positive Auswirkung auf die Zellviabilität und eine Hemmung der Zelldifferenzierung.

3.3 Funktionelle Validierung des postulierten Einflusses von Interleukin-16

In diesem Abschnitt der Arbeit wurden die durch die Genexpressionsanalysen postulierten Effekte von IL-16 in verschiedenen funktionellen Analysen verifiziert. Es wurden speziell das Wachstumsverhalten, die Viabilität und die Apoptose untersucht.

Die folgenden Versuchsreihen wurden mit der Zelllinie RPMI-8226 unter sechs verschiedenen Expressionsbedingungen durchgeführt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Verwendete Bedingungen für die Validierung des Einflusses von IL-16 auf verschiedene funktionelle Systeme

	Nomenklatur	Verwendete shRNAmir	Infektion mit MOI	Induktion der shRNAmir Expression durch Doxycylin
Analysegruppe 1	IL-16-Knockdown	shRNA2	5	ja
	uninduzierte Kontrolle	shRNA	5	nein
	unspezifische Kontrolle	Negativkontrolle	5	ja
Analysegruppe 2	IL-16-Knockdown	shRNA2	10	ja
	uninduzierte Kontrolle	shRNA	10	nein
	unspezifische Kontrolle	Negativkontrolle	10	ja

Der potentielle, funktionelle Einfluss von IL-16 wurde anhand der Genexpressionsanalyse von Myelomzellen abgeleitet, die zuvor mit einer MOI 10 der shRNAmir-exprimierenden Viruspartikel infiziert wurden. Um mögliche Seiteneffekte zu glätten, die durch die zufällige positionelle Integration der transgenen Sequenzen in das Zielzellgenom erzeugt werden

können, wurden neben den stabil transduzierten Zellen der MOI 10, ebenfalls Linien der MOI 5 für die funktionelle Erforschung von IL-16 verwendet. Darüber hinaus konnte durch den Vergleich der erzielten Ergebnisse beider Ansätze die Einheitlichkeit des erzeugten Effekts bewertet werden. Alle Versuche wurden mindestens dreimal, unter Gleichhaltung der Bedingungen wiederholt. Es wurden zwei verschiedene Kontrollen gewählt, um die Vorteile beider zu nutzen und mögliche Ungenauigkeiten zu neutralisieren, die zur falschen Schlussfolgerung veranlassen könnten. Bei der uninduzierten Kontrolle wurden die Zellen zum Versuchsstart aus derselben Kultur entnommen wie die Zellen, bei denen direkt danach die Doxycyclinzugabe zur shRNAmir Induktion erfolgte. Demnach wies dieses Kontrollsystem eine unmittelbare Nähe zum physiologischen Zustand der Versuchsgruppe auf. Diese Nähe konnte zu der unspezifischen Kontrolle nicht gewährleistet werden, da die Zellen mit unterschiedlichen shRNAmir-Sequenzen lentiviral transduziert wurden und sie danach noch eine Antibiotikaselektion durchliefen. Ein Nachteil der uninduzierten Kontrolle war jedoch, dass trotz fehlender Induktion eine minimale Expression der shRNAmir stattfand. Diese Zellen wiesen im Vergleich zu den unspezifisch transduzierten sowie zu gänzlich untransduzierten Zellen leicht reduzierte IL-16-Expressionslevel auf. Ein weiterer, durch die unspezifische Kontrolle abgedeckter Vorteil besteht in den gleichartigen Induktionsbedingungen. Fehlinterpretationen, die möglicherweise auf Doxycyclin zurückzuführen sind, werden dadurch umgangen.

3.3.1 Interleukin-16 begünstigt das Wachstum von Myelomzellen

Der stärkste Trend, der von den Genexpressionsanalysen abgeleitet werden konnte, war die Reduktion der Expression proliferationsfördernder Gene in Abwesenheit von IL-16. Ob sich diese Tendenz im Phänotyp der Myelomzellen widerspiegelt, wurde im vorliegenden Abschnitt anhand unterschiedlicher Nachweismethoden geprüft.

3.3.1.1 Die Abwesenheit von Interleukin-16 führt zur verminderten Proliferation

Zunächst erfolgte die Beobachtung des Zellkulturwachstums in IL-16-positiven und künstlich IL-16-negativen Myelomzellen (**Abbildung 10**). Bis zu 48 h nach Induktion der shRNAmir-Expression wuchsen die Kontrollgruppen und die Versuchsgruppe relativ ähnlich. Sowohl bei der ersten als auch bei der zweiten Analysegruppe war erstmalig nach 72 h eine Wachstumsverzögerung in der IL-16-Knockdown Zelllinie erkennbar. Der Unterschied nahm

über den Zeitverlauf zu, jedoch stellten die Zellen mit fehlender IL-16-Expression ihre Proliferation nicht vollkommen ein.

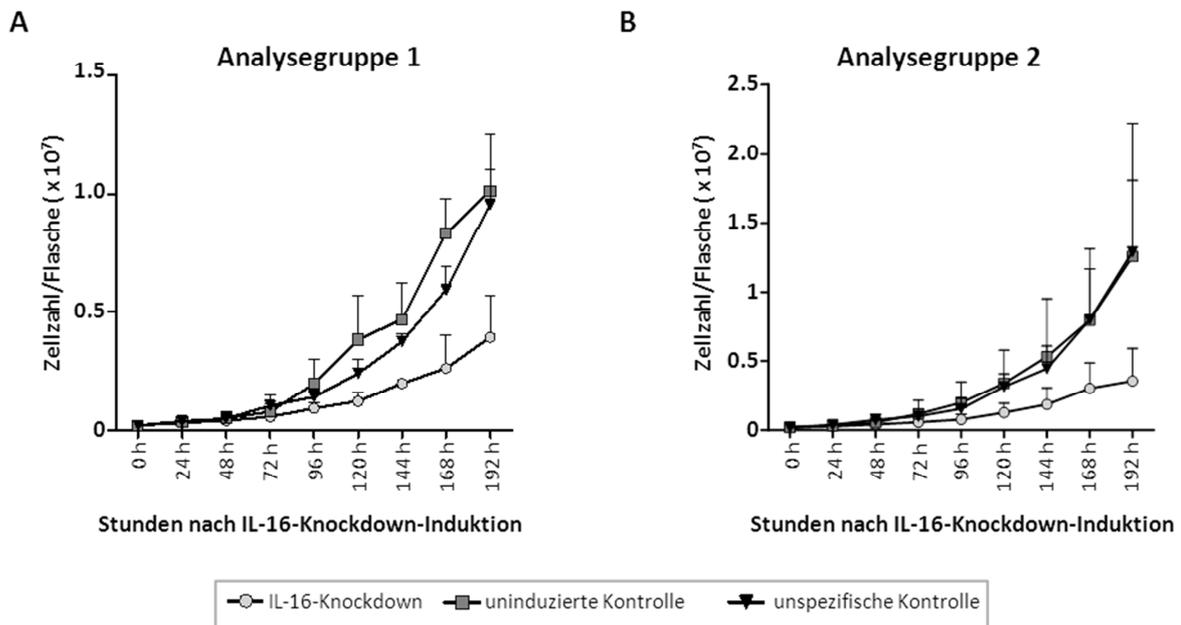


Abbildung 10: Reduziertes Wachstumsverhalten der IL-16-Knockdown-Zellen

Durch die tägliche Bestimmung der Zellzahl innerhalb der Zellkultur wurde das Wachstumsverhalten von Myelomzellen intakter sowie fehlender IL-16-Expression ermittelt. Die Versuchsserie startete zum Zeitpunkt der Induktion der shRNAmir-Expression. Der Versuch wurde in zwei unabhängigen Analysegruppen (A und B) insgesamt dreimal unter Gleichhaltung der Bedingungen wiederholt. Die Messpunkte bilden die Mittelwerte ab. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung.

Tabelle 12 gibt einen Überblick über die Teilungsraten der verschiedenen Versuchsgruppen und die relative Veränderung des Wachstumsverhaltens der Knockdown-Zellen gegenüber den Kontrollzellen. In beiden Analysegruppen konnte eine durchschnittliche Proliferationsreduktion von ca. 13 % ermittelt werden.

Tabelle 12: Wachstumsverhalten der Myelomzellen nach IL-16-Knockdown

	Zellen	Verdopplungsrate pro 24 h	Verdopplungsrate relativ zur uninduz. Kontrolle	Verdopplungsrate relativ zur unspez. Kontrolle
Analysegruppe 1	IL-16-Knockdown	1,487		
	uninduzierte Kontrolle	1,712	86,7 %	87,3 %
	unspezifische Kontrolle	1,680		
Analysegruppe 2	IL-16-Knockdown	1,443		
	uninduzierte Kontrolle	1,693	85,2 %	89,7 %
	unspezifische Kontrolle	1,608		

Weiterhin wurde ein hoch sensitiver Test zum Nachweis der relativen Replikationsfrequenz angewendet, um die Beobachtungen des Wachstumsverhaltens in der Zellkultur weiter zu

verifizieren. Hierzu wurde das Zellkulturmedium für 16 h mit ^3H -Thymidin versetzt, welches während des Replikationsprozesses in die DNA eingebaut und später detektiert wurde. Anders als die oben beschriebene Zellzahlbestimmung, die über einen längeren Zeitraum verläuft, bildet dieses Verfahren eher eine Momentaufnahme ab. An Tag 4 der shRNAmir-Induktion wurde in beiden Analysegruppen eine signifikante Reduktion des Proliferationsverhaltens von IL-16-Knockdown Zelllinien beobachtet (Abbildung 11).

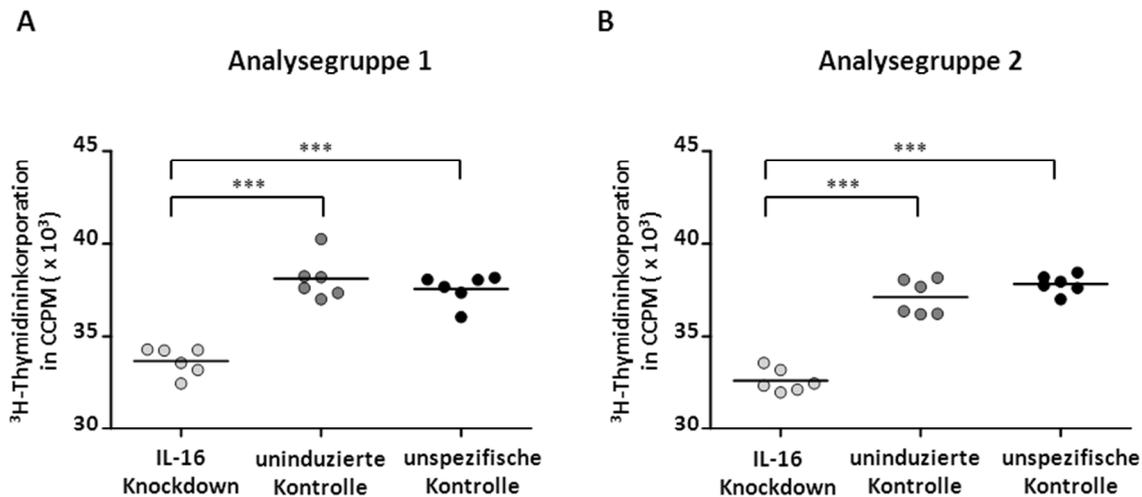


Abbildung 11: Proliferationsassay nach IL-16-Knockdown

Dieser Proliferationsassay basiert auf der Detektion von radioaktiven ^3H -Thymidin, welches in die DNA replizierender Zellen inkorporiert wird. Der Messzeitpunkt war an Tag 4 nach Induktion der shRNAmir. Der Versuch wurde in zwei unabhängigen Analysegruppen (A und B) insgesamt sechsmal unter Gleichhaltung der Bedingungen wiederholt. Ein Punkt steht für den Mittelwert der technischen Triplikate jeder Wiederholung. Der Balken bildet die Mittelwerte aller Wiederholungen ab. Die Berechnung der Signifikanzniveaus erfolgte über den gepaarten t-Test: (A): IL-16 k. d. vs. uninduzierte Kontrolle: $\text{mean}\Delta$: -44 569 CCPM; $p = 0,0001$; IL-16 k. d. vs. unspezifische Kontrolle: $\text{mean}\Delta$: -39 032 CCPM; $p = 0,0007$ (B): IL-16 k. d. vs. uninduzierte Kontrolle: $\text{mean}\Delta$: -45 074 CCPM; $p < 0,0001$; IL-16 k. d. vs. unspezifische Kontrolle: $\text{mean}\Delta$: -52 156 CCPM; $p < 0,0001$

Das Proliferationsverhalten der Zellen nahm innerhalb der Analysegruppe 1 im Vergleich zur Kontrollgruppe um durchschnittlich 11,1 % ab. In der Analysegruppe 2 wurde eine Verminderung der Proliferationsrate von 13 % erfasst (Tabelle 13).

Tabelle 13: ^3H -Thymidin-Inkorporation als Maß der Replikationsfrequenz von Myelomzellen nach IL-16-Knockdown

	Zellen	\emptyset CCPM	Replikationsfrequenz relativ zur uninduz. Kontrolle	Replikationsfrequenz relativ zur unspez. Kontrolle
Analysegruppe 1	IL-16-Knockdown	336.384		
	uninduzierte Kontrolle	380.953	88,3 %	89,6 %
	unspezifische Kontrolle	375.416		
Analysegruppe 2	IL-16-Knockdown	325.931		
	uninduzierte Kontrolle	371.005	87,8 %	86,2 %
	unspezifische Kontrolle	378.087		

Die zwei unabhängigen Methoden zur Verifizierung des Wachstumsverhaltens von Myelomzellen mit bzw. ohne IL-16-Expression zeigten einheitlich einen mitogenen Effekt des Cytokins. Bei fehlender IL-16-Expression konnte das Wachstum bis zu 15 % reduziert werden.

3.3.1.2 Das Proliferationsverhalten korreliert mit der Sekretion von bioaktivem Interleukin-16

Aufgrund der vorhergehenden Ergebnisse, die einen signifikanten proliferativen Effekt von IL-16 in Zellen des Multiplen Myeloms aufzeigten, wurde in einer Korrelationsanalyse ergründet, ob das Wachstumsverhalten der unter physiologischen Bedingungen kultivierten Myelomzellen von der Menge des autokrin sekretierten IL-16 bedingt wird.

Dazu wurden simultane Analysen zur Erfassung der Replikationsfrequenz verschiedener Zelllinien sowie Nachweisverfahren zur Sezernierung von bioaktivem IL-16 durchgeführt. Wurde das Proliferationsverhalten einer Myelomzellpopulation in Abhängigkeit zur Anzahl der IL-16-sekretierenden Zellen innerhalb dieser Population dargestellt, so konnte eine signifikante lineare Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $\rho = 0,746$ ($R^2 = 0,557$) abgeleitet werden (Abbildung 12A).

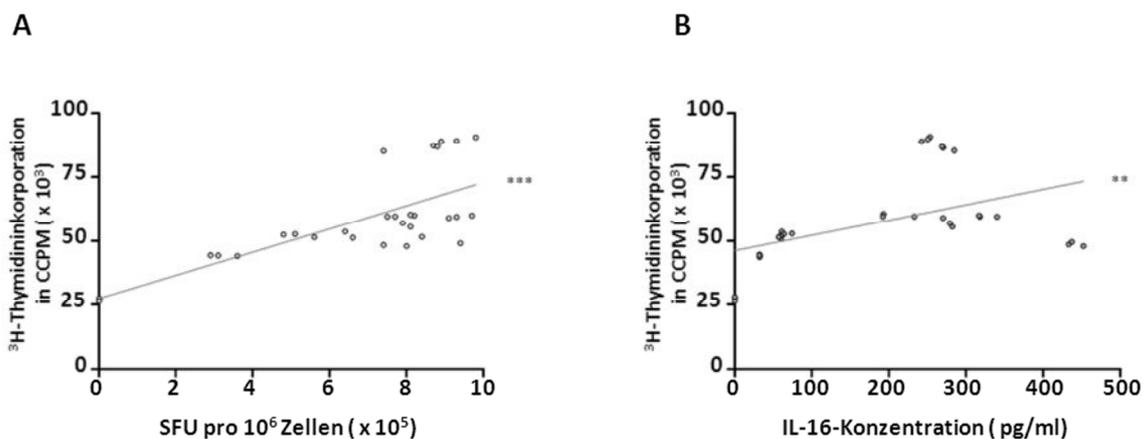


Abbildung 12: Korrelation von Zellproliferation und IL-16-Sekretion in Myelomzellen

(A) Mithilfe eines ^3H -Thymidin-basierten Proliferationsassays wurde das Wachstumsverhalten zehn verschiedener Myelomzellen bestimmt. Simultan wurde in einem ELISPOT die Anzahl IL-16-sezernierender Zellen (SFU) der jeweiligen Zellkultur ermittelt. Der Versuch wurde an drei verschiedenen Zeitpunkten wiederholt. Ein Messpunkt bildet die Replikationsfrequenz in Abhängigkeit zur SFU einer Myelomzelllinie zu einem Messzeitpunkt ab. Der Zusammenhang der Messpunkte wurde durch eine Regressionsgerade beschrieben ($\rho = 0,746$, $R^2 = 0,557$, $p < 0,0001$). (B) Analog zu (A) wurde hier die sezernierte IL-16-Proteinmenge als Repressor gewählt. Die IL-16-Konzentrationsbestimmung der Zellkulturüberstände von Myelomzelllinien erfolgte mithilfe eines ELISAs. Der Versuch wurde ebenfalls zeitgleich zu den anderen Versuchen durchgeführt und an drei verschiedenen Zeitpunkten wiederholt. Ein Messpunkt bildet die Replikationsfrequenz in Abhängigkeit zur IL-16-Konzentration im Kulturüberstand einer Myelomzelllinie zu einem Messzeitpunkt ab. Der Zusammenhang der Messpunkte wurde auch hier durch eine Regressionsgerade beschrieben ($\rho = 0,473$, $R^2 = 0,224$, $p < 0,0083$).

Auch die Abbildung des Proliferationsverhaltens zur sezernierten IL-16-Proteinmenge zeigte einen linearen Zusammenhang auf, wenngleich schwächer als jener zur Anzahl IL-16-sekretierender Zellen (**Abbildung 12B**). Der Korrelationskoeffizient betrug in dem Fall $\rho = 0,473$ ($R^2 = 0,224$). Hiermit konnte zum ersten Mal ein korrelierender Zusammenhang der Myelomzellproliferation und der extrazellulären IL-16-Konzentration bzw. der Anzahl IL-16-sekretierender Zellen gezeigt werden.

Die drei verschiedenen Wachstumsanalysen untermauern die Hypothese der progressiven Wachstumsförderung neoplastischer Plasmazellen durch das Cytokin IL-16.

3.3.2 Interleukin-16 ist bedeutend für die S-Phase-G₂-Phase-Transition im Zellzyklus

3.3.2.1 Interleukin-16 beeinflusst den Zellzyklusphasenverteilung

Aus den vorhergehenden Analysen konnte eine mitogene Wirkung von IL-16 auf die Myelomzellen abgeleitet werden. Um diesen Effekt des Cytokins detaillierter beschreiben zu können, folgten Zellzyklusanalysen mit Myelomzellen herabregulierter IL-16-Expression, die Aufschluss über eventuelle Verschiebungen in der Populationsstärke der Zyklusphasen lieferten. Diese Untersuchungen erfolgten durchflusszytometrisch nach dem in **Abbildung 13** abgebildeten Gating- und Färbeschema. Anhand der Stärke der BrdU Inkorporation und der 7 AAD Interkalierung in die DNA können die Zellzyklusphasen unterschieden werden. Die in der G₀/G₁ Phase befindlichen Zellen besitzen einen einfachen Chromosomensatz. Die Zellen der S Phase replizieren ihren Chromosomensatz, wodurch das Thymidin Analogon BrdU in die DNA eingebaut wird. Zellen der G₂ Phase liegen im doppelten Chromosomensatz vor. Der DNA interkalierende Farbstoff 7 AAD erzeugt in den Zellen daher ein stärkeres Signal.

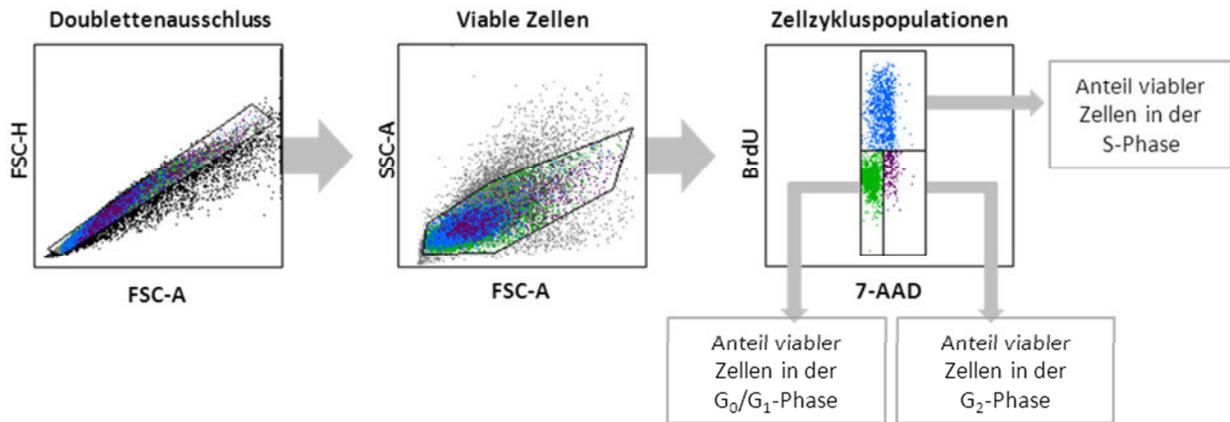


Abbildung 13: Gatingschema zur Ermittlung der Zellzyklusphasenverteilung nach IL-16-Knockdown

Um verlässliche Daten zur Zellzyklusphasenverteilung innerhalb einer Zellkultur durchflusszytometrisch erfassen zu können, müssen zunächst die für die Messung relevanten Zellen selektiert werden. Diese erfolgte über die dargestellte Gatingstrategie. Zunächst erfolgte ein Ausschluss zusammenhängender Zellen (Doubletten). Die Messung wurde an viable Zellen vorgenommen, die im Vorwärts /Seitwärtsstreulicht eingegrenzt wurden. Im nächsten Schritt wurden die Zellen der verschiedenen Zellzyklusphasen mithilfe einer BrdU und 7 AAD Färbung erfasst und deren relativer Anteil innerhalb der Gesamtpopulation ermittelt.

An verschiedenen Tagen nach der Induktion des IL-16-Knockdowns wurde der Anteil der Zellen innerhalb der verschiedenen Zellzyklusphasen ermittelt, um mögliche Veränderungen in der Populationsgröße zu identifizieren (**Abbildung 14**).

Innerhalb der ersten Analysegruppe (**Abbildung 14A**) war eine fortwährende Abnahme der G_2 -Population IL-16-negativer Zellen erkennbar. An Tag 14 zeigten diese Zellen dann, verglichen zu beiden Kontrollzellen, eine signifikante Dezimierung von 52 – 53 % der in der G_2 -Phase befindlichen Population. Die über den Zeitverlauf kontinuierliche Reduktion der G_2 -Phase Population wurde durch eine Akkumulation in der G_0/G_1 -Phase, zeitweilig auch in der S-Phase kompensiert. Der Vergleich zu beiden Kontrollgruppen ergab teilweise unterschiedliche Tendenzen. Relativ zu den IL-16-positiven Zellen der uninduzierten Versuchsgruppe sammelten sich die IL-16-negativen Zellen ab Tag 4 vermehrt in der G_0/G_1 -Phase an. Der Anteil der G_0/G_1 -Phase Zellen war mit einer relativen Differenz von 16 % an Tag 14 signifikant höher, als in der entsprechenden Kontrollgruppe. Die S-Phase-Population hingegen erfährt eine sukzessive Verminderung und bestand an Tag 14 aus 19 % weniger Zellen als die uninduzierten Kontrollzellen. Im Vergleich zur unspezifischen Kontrolle zeigten die Zellen ohne IL-16-Expression schon ab Tag 2 einen größeren Anteil an G_0/G_1 -Phase-Zellen mit leichten Schwankungen in der Ausprägung. An Tag 14 war die G_0/G_1 -Phase-Population 11 % größer als die entsprechende Population der Kontrollzellen. Analog dazu befand sich ein

geringerer Anteil der IL-16-negativen Zellen in der S-Phase als bei den Zellen mit intakter IL-16-Expression. Am Versuchsende betrug die relative Differenz ca. 12 %.

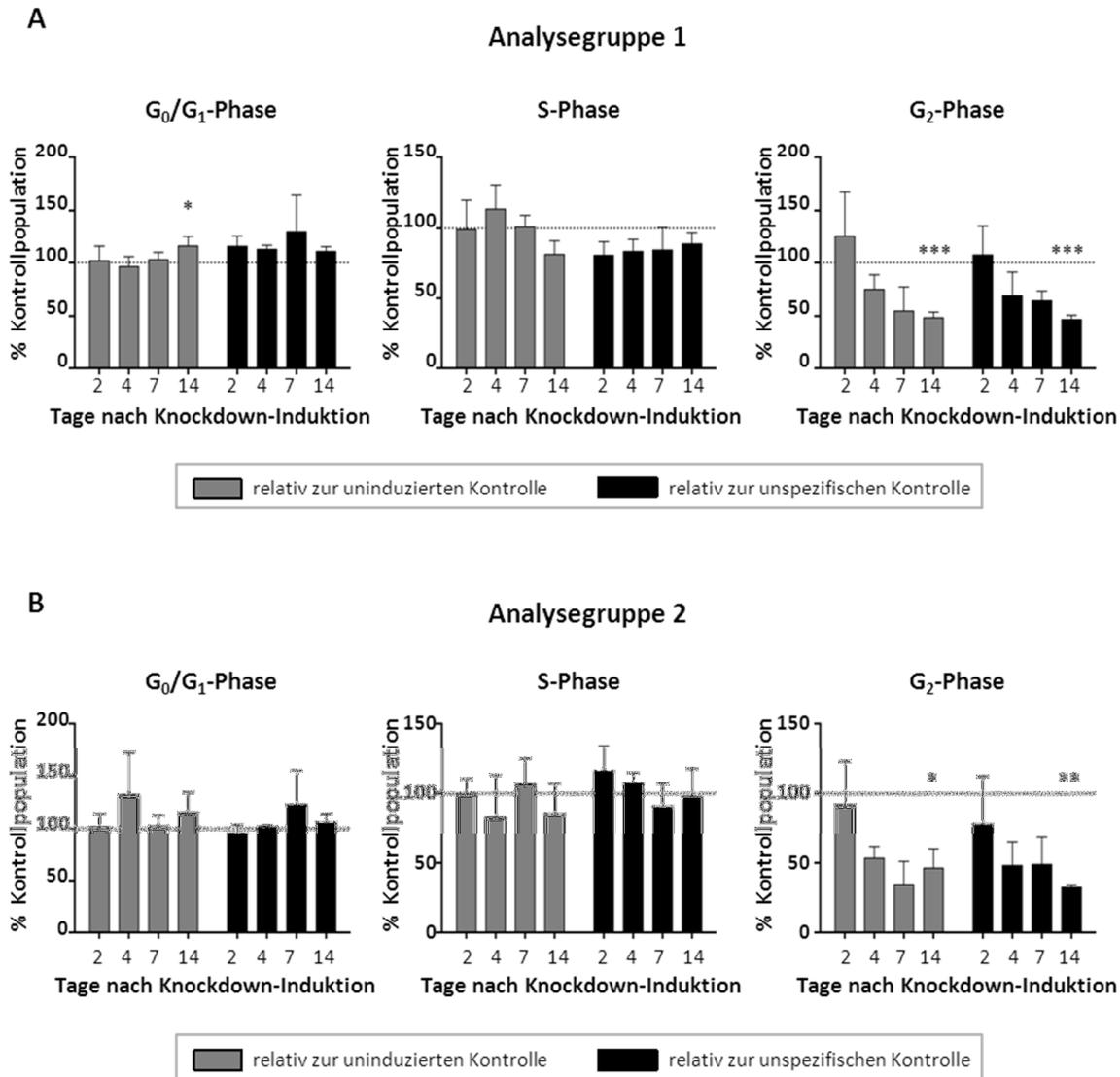


Abbildung 14: Einfluss von IL-16 auf den Zellzyklusprogress

Gezeigt sind die Ergebnisse von Durchflussanalysen zur Ermittlung der Populationsgröße der in den verschiedenen Zellzyklusphasen befindlichen Zellen. An den verschiedenen Tagen nach Induktion des IL-16-Knockdowns wurden die relativen Anteile der Zellen bestimmt, die sich in der G_0/G_1 -, S-, oder G_2 -Phase befanden. Zum Beispiel befanden sich an Tag 2 60 % der IL-16-negativen Zellen in der G_0/G_1 -Phase, 36 % in der S-Phase und 4 % in der G_2 -Phase. Ebenfalls wurden die relativen Anteile für die zwei verschiedenen Kontrollzellen erfasst. Zum Beispiel befanden sich an Tag 2 59 % der IL-16-positiven Zellen der uninduzierten Kontrolle in der G_0/G_1 -Phase, 38 % in der S-Phase und 3 % in der G_2 -Phase. Daraus wurde die relative Populationsgröße der IL-16-Knockdown Zellen bezüglich der uninduzierten Kontrolle (graue Säulen) sowie bezüglich der unspezifischen Kontrolle (schwarze Säulen) errechnet, und zwar zu den unterschiedlichen Messtagen und für alle drei Phasen. Zum Beispiel war die Population der G_0/G_1 -Phase-Zellen an Tag 2 $60\%/59\% = 1,02\%$ größer als die G_0/G_1 -Phase-Population der uninduzierten Kontrolle. Der Versuch wurde für zwei unabhängige Analysegruppen (A und B) durchgeführt. Die Höhe der Säulen bildet die Mittelwerte aus drei Wiederholungen ab. Die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken wiedergegeben. Die Berechnung der Signifikanzniveaus erfolgte über eine One-way ANOVA mit anschließendem Tukey's post-Test. (A) G_0/G_1 -Phase d14 uninduz.: $p = 0,0367$; G_2 -Phase d14 uninduz.: $p = 0,0006$; G_2 -Phase d14 unspez.: $p = 0,0004$; (B) G_0/G_1 -Phase d14 uninduz.: $p = 0,0235$; G_2 -Phase d14 unspez.: $p = 0,0019$

Innerhalb der zweiten Analysegruppe (**Abbildung 14B**) wurde ebenfalls eine signifikante Dezimierung der G₂-Phase-Population ermittelt. Insgesamt waren dabei die Schwankungen innerhalb der einzelnen Versuche etwas stärker, was in dieser Analysegruppe ein diffuseres Bild erzeugte. Beispielsweise wurde im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle eine Schrumpfung des G₂-Phase Anteils von 54 % erfasst, wohingegen im Vergleich mit der unspezifischen Kontrolle diese Schrumpfung bei 69 % lag. Der Anteil der G₀/G₁-Phase-Zellen schwankte an den verschiedenen Messtagen, war aber zumeist gleich groß oder größer als die G₀/G₁-Population der uninduzierten Kontrollzellen. Für die Verteilung in der S-Phase ergab sich hingegen ein reverses Bild. Im Vergleich zur unspezifischen Kontrolle akkumulierten die IL-16-negativen Zellen tendenziell in der G₀/G₁-Phase, während der Anteil in der S-Phase etwas schrumpfte.

Aufgrund der signifikant dezimierten G₂-Population in IL-16-negativen Zellen scheint das Cytokin bedeutend für die Zellzyklusprogression der Myelomzellen von der S-Phase in die G₂-Phase zu sein.

3.3.2.2 Die Interleukin-16-Proteinexpression ist in den verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedlich stark ausgeprägt

Aus den oben beschriebenen Versuchen konnte abgeleitet werden, dass der Verlust von IL-16 in eine Zellzyklusverzögerung mündet, die sich durch eine signifikante Reduktion der G₂-Population widerspiegelt. Im Umkehrschluss würde das Vorhandensein von IL-16 den Zellzyklusprogress unterstützen. Hinzu kam, dass bei der Versuchsdurchführung und Auswertung eines Versuches mit unbehandelten Myelomzellen, der im Rahmen dieser Arbeit nicht dargestellt wurde, explorativ eine divergente Fluoreszenzintensität der IL-16-spezifischen Signale der unterschiedlichen Zellzyklusphasen aufgefallen war. Dabei gilt, je intensiver das Fluoreszenzsignal, desto stärker ist die entsprechende Proteinexpression. Beides gab Anlass, in einem separaten Experiment zu überprüfen, ob sich das IL-16-Expressionsmuster innerhalb der verschiedenen Zellzyklusphasen unterscheidet und die Expression demnach phasenabhängig reguliert ist.

Für eine relative Quantifizierung der IL-16-Proteinexpression innerhalb der unterschiedlichen Zellzyklusphasen wurden erneut Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie ausgeführt. Das angewandte Gatingsschema ist in **Abbildung 15** abgebildet und ähnelt in den ersten beiden Stufen der bekannten Gatingstrategie aus **Abbildung 13** (siehe **Kapitel 3.3.2.1**). Auf der dritten

Ebene werden die verschiedenen Zellpopulationen eingegrenzt. In dem vorliegenden Versuch wurden die Zellen neben der 7-AAD und BrdU-Färbung auch gegen IL-16 und GAPDH gefärbt. Anhand eines Histogramms wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten der IL-16- bzw. GAPDH-Signale innerhalb der verschiedenen Zyklusphasen detektiert.

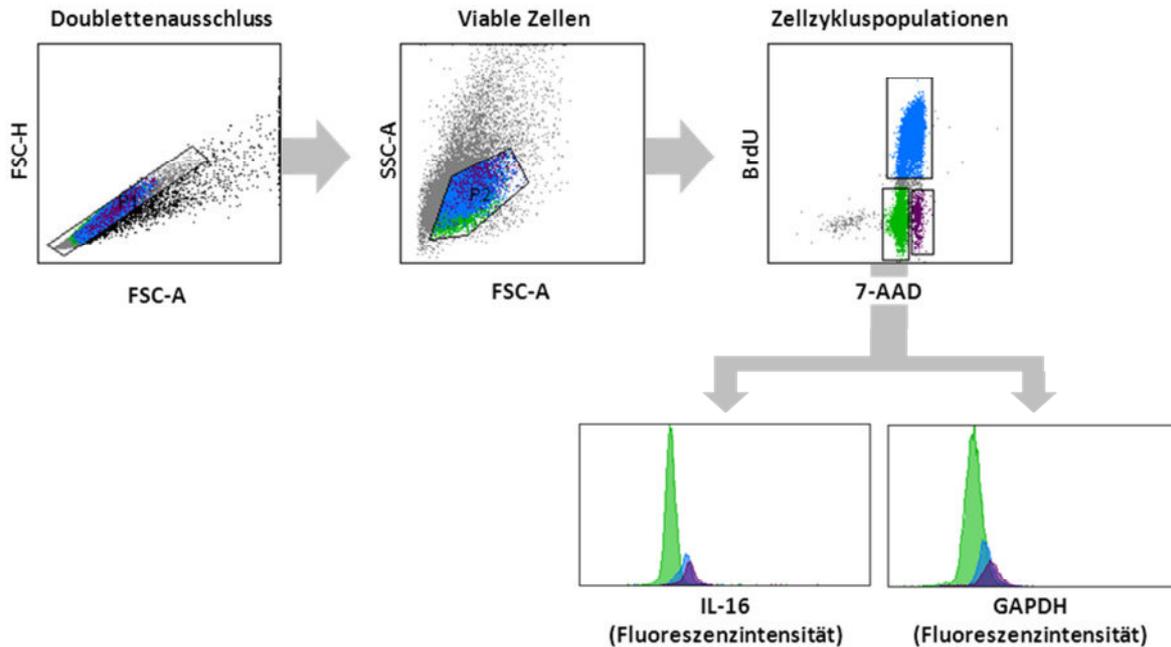


Abbildung 15: Gatingschema zur Quantifizierung der IL-16-Expression in den verschiedenen Zellzyklusphasen

Für die durchflusszytometrische Ermittlung der IL-16-Expressionsmuster innerhalb der verschiedenen Zellzyklusphasen wurden die Zellen nach dem abgebildeten Schema eingegrenzt. Dem Doublettenausschluss schloss sich die Selektion der viablen Zellen an. Bei der Eingrenzung der Zellzykluspopulationen, die anhand der BrdU- und 7-AAD-Färbung geschah, wurde vermehrt Wert auf eine reine Phase, weniger aber auf eine vollständig erfasste Phase gelegt. In einem Histogramm wurden die Fluoreszenzintensitäten der antigenspezifischen Signale (IL-16 bzw. GAPDH) abgebildet und quantifiziert. Die G₀/G₁-Phase wird durch die grüne Population, die S-Phase durch die blaue und die G₂-Phase durch die auberginefarbene Population abgebildet.

Für die Analyse wurden drei Myelomzelllinien ausgewählt, die einen hohen Anteil IL-16-exprimierender Zellen aufweisen sowie Subpopulationen, die unterschiedlich starke Signalintensitäten besitzen. Mittels Zellzyklusfärbung konnten die einzelnen Phasen hinsichtlich ihrer IL-16-Expression charakterisiert werden. Dabei wurde belegt, dass sich die mittleren Fluoreszenzintensitäten der IL-16-Signale der einzelnen Phasen signifikant voneinander unterscheiden (Daten nicht gezeigt). Um keine fehlerhaften Rückschlüsse zu ziehen und die phasenbedingten Schwankungen des generellen Proteingehalts zu berücksichtigen, erfolgte eine simultane Bestimmung der GAPDH-Expressionslevel, die als Referenz diente (Abbildung 16A).

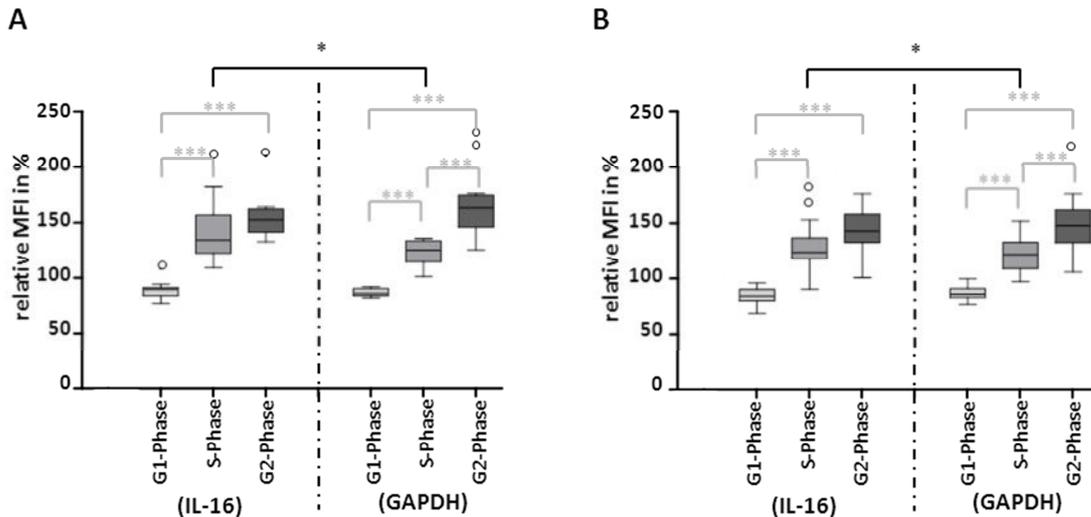


Abbildung 16: Zellzyklusphasenabhängige Expression von IL-16

Das zellzyklusphasenabhängige Expressionsprofil von IL-16 wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Abgebildet sind die relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten der Antigene in den Zellzyklusphasen. Sie gingen aus der Normalisierung der Signalstärke der einzelnen Phasen zur Signalstärke der Gesamtpopulation hervor. (A) bildet die Ergebnisse drei unbehandelter, stark IL-16-exprimierender Myelomzelllinien ab. (B) schließt zehn verschiedene Myelomzelllinien unterschiedlichster Expressionsmuster und Expressionsstärken ein. Die Versuche wurden für jede Zelllinie in drei unabhängigen Experimenten wiederholt. Der Box-Whisker-Plot wurde nach dem Tukey-Modell erstellt. Der Bereich zwischen dem oberen und unteren Quartil wird durch die Box abgedeckt. Der Strich innerhalb der Box kennzeichnet den Median. Der obere und der untere Whisker begrenzen das 1,5-fache des Interquartilsabstandes. Werte, die sich außerhalb dieser Begrenzungen befinden, werden in Form des kleinen Kreises als Ausreißer markiert. Die Berechnung der Signifikanzniveaus erfolgte über den gepaarten t-Test: (A): G_0/G_1 (IL-16) vs. S (IL-16): $\text{mean}\Delta$: -53,1 %-Punkte, $p < 0,0001$; G_0/G_1 (IL-16) vs. G_2 (IL-16): $\text{mean}\Delta$: -66,4 %-Punkte, $p < 0,0001$; G_0/G_1 (GAPDH) vs. S (GAPDH): $\text{mean}\Delta$: -36,6 %-Punkte, $p < 0,0001$; G_0/G_1 (GAPDH) vs. G_2 (GAPDH): $\text{mean}\Delta$: -79,5 %-Punkte, $p < 0,0001$; S (GAPDH) vs. G_2 (GAPDH): $\text{mean}\Delta$: -42,9 %-Punkte, $p = 0,0007$; S (IL-16) vs. G_2 (GAPDH): $\text{mean}\Delta$: 18,5 %-Punkte, $p = 0,0312$; (B): G_0/G_1 (IL-16) vs. S (IL-16): $\text{mean}\Delta$: -50 %-Punkte, $p < 0,0001$; G_0/G_1 (IL-16) vs. G_2 (IL-16): $\text{mean}\Delta$: -59,9 %-Punkte, $p < 0,0001$; G_0/G_1 (GAPDH) vs. S (GAPDH): $\text{mean}\Delta$: -35,3 %-Punkte, $p < 0,0001$; G_0/G_1 (GAPDH) vs. G_2 (GAPDH): $\text{mean}\Delta$: -62,9 %-Punkte, $p < 0,0001$; S (GAPDH) vs. G_2 (GAPDH): $\text{mean}\Delta$: -26,07 %-Punkte, $p < 0,0001$; S (IL-16) vs. G_2 (GAPDH): $\text{mean}\Delta$: 13,3 %-Punkte, $p = 0,0181$

Zur Generierung der Vergleichbarkeit beider Antigene wurden die detektierten, phasenspezifischen Fluoreszenzintensitäten jeweils zur mittleren Signalstärke der Gesamtpopulation normalisiert. Aufgrund der Vorbereitung auf die Zellteilung ist erwarteter Weise sowohl IL-16 als auch GAPDH in der S- und G_2 -Phase im Vergleich zur G_0/G_1 -Phase vermehrt vorhanden. Allerdings zeigt nur das GAPDH-Expressionsprofil einen signifikanten Unterschied zwischen der S- und der G_2 -Phase, nicht aber jenes von IL-16. Die relativen Expressionsstärken beider Proteine in der G_0/G_1 -Phase waren nahezu identisch. Die normalisierten mittleren Fluoreszenzintensitäten der G_2 -Phase erreichten bei GAPDH leicht höhere Werte, als bei IL-16. Einen erkennbaren Unterschied ließ hingegen der Vergleich der Expressionsniveaus innerhalb der S-Phase zu. Der relative Proteingehalt an IL-16 war dabei signifikant höher, als der von GAPDH.

Weiterhin wurde untersucht, ob der beobachtete Sachverhalt ebenfalls im Kontext der Gesamtheit verschiedenster Myelomzelllinien mit differenzierter Ausprägung der generellen IL-16-Expression Gültigkeit behält. Daher wurde der Versuch unter Einschluss der Zelllinien mit weniger stark ausgeprägter sowie schwächer diversifizierter IL-16-Expression wiederholt (**Abbildung 16B**). Damit ließ sich ein identisches Bild erzeugen, wie bei der isolierten Analyse der Zelllinien mit starker IL-16-Expression. Das deutet auf eine zellzyklusphasenabhängige Regulation der IL-16-Expression hin, die losgelöst von der generellen Expressionsstärke zu sein scheint.

Die signifikant erhöhten IL-16-Proteinmengen innerhalb der S-Phase-Population von Wildtyp-Myelomzelllinien lassen auf eine spezifische biologische Bedeutung des Cytokins innerhalb dieser Phase des Zellzyklusses zu. In Verbindung mit den zuvor erhobenen Daten über die signifikante Reduktion der G₂-Phase-Population nach IL-16-Knockdown stützen die Hypothese, IL-16 stimuliere den Zellzyklusprogress von der S-Phase zur G₂-Phase.

3.3.3 Interleukin-16 stimuliert die Aktivierung mehrerer Proliferationsignalwege

Die Ergebnisse der vorherigen Versuche lassen sich zu einer gemeinsamen Grundaussage bündeln: das Wachstums- und Teilungsverhalten von Myelomzellen wird durch IL-16 aktivierend moduliert. Damit ist der erste, anhand der Genexpressionsanalyse postulierte Effekt von IL-16 bestätigt. Über welche Aktivierungskaskaden das Cytokin seine proliferationsfördernde Wirkung ausübt, wurde anhand von multiarraybasierten Signalweganalysen eruiert. Dafür wurden drei verschiedene Proliferations-Pathways ausgewählt, die sowohl im Multiplen Myelom als auch in zahlreichen anderen Tumorentitäten die Pathogenese maßgeblich beeinflussen.^{294–298}

Untersucht wurden der PI3-Kinase-, NFκB- und der MAP-Kinase-Pathway in IL-16-negativen und IL-16-positiven Myelomzelllinien. Pro Array wurde die Modulation von 84 verschiedenen Genen untersucht, unter denen sich sowohl Mitglieder als auch Regulatoren des Signalweges befanden, die einen charakteristischen Überblick des jeweiligen Pathways gaben. Die Ergebnisse wurden mithilfe der webbasierten RT² ProfilerTM PCR Array Data Analysis Software von SABioscience ausgewertet.²⁹⁹ In die **Abbildung 17** wurden alle Gene aufgenommen, die mindestens eine $\pm 1,3$ fache Expressionsveränderung vorwies. Die in den einschlägigen Fachzeitschriften publizierten Funktionen der einzelnen regulierten Gene sind teilweise hoch

diversifiziert dargestellt. Um eine Überinformation zu vermeiden, wurden jedoch an hiesiger Position die Funktionen der durch IL-16-regulierten Gene auf vier verschiedene Kategorien eingegrenzt, welche die etablierten Haupteffekte der untersuchten Signalwege sowie deren Gegenspieler am deutlichsten widerspiegeln. Demnach erfolgte die Einteilung in pro- und anti-proliferative Gene sowie pro- und anti-apoptotische Gene. Die Zuordnung der Gruppenzugehörigkeit erfolgte mithilfe des *ToppGene* Portals³⁰⁰, welches eine genontologische Eingruppierung eines Gensets vornehmen kann, die auf der GO-Terminologie des Gene Ontology Konsortium basiert. Der Vorteil über dem originären Gene Ontology Portal bestand darin, dass nicht nur die Anzahl der regulierten Gene innerhalb eines GO-Terms ausgegeben wurde, sondern eine Zusatzinformation darüber erhalten wurde, welche Gene in dieser Gruppe inkludiert wurden. Da in dieser Analyse der Phänotyp des Multiplen Myeloms untersucht wurde, wurde der GO-Term „*positive regulation of Interleukin-6 production*“ mit einbezogen, da IL-6 zu den bedeutendsten Wachstumsfaktoren dieser Tumorentität zählt.^{301–307} Mehrere durch *ToppGene* aufgezeigte GO-Gruppen wurden zu einem Haupteffekt zugeordnet (Tabelle 14). Diese starke Kondensation der eingangs angebotenen Datenvielfalt (unzählige Einzelpublikationen über spezifische Genfunktionen → Eingruppierung in verschiedenen GO-Termen → Kategorisierung zu einen Haupteffekt) diente der Sicherstellung der Übersichtlichkeit.

Tabelle 14: Zuordnung verschiedener GO-Terms zu einer funktionellen Kategorie

Kategorie	GO Term ³⁰⁰	Originalbezeichnung des GO-Terms
pro-proliferativ	GO:0008284	<i>positive regulation of proliferation</i>
	GO:0045787	<i>positive regulation of cell cycle</i>
	GO:0010628	<i>positive regulation of gene expression</i>
	GO:0001775	<i>cell activation</i>
	GO:0032675	<i>positive regulation of Interleukin-6 production</i>
anti-proliferativ	GO:0008285	<i>negative regulation of proliferation</i>
	GO:0045786	<i>negative regulation of cell cycle</i>
	GO:0007050	<i>cell cycle arrest</i>
pro-apoptotisch	GO:0043065	<i>positive regulation of apoptotic process</i>
	GO:0006917	<i>induction of apoptosis</i>
anti-apoptotisch	GO:0043066	<i>negative regulation of apoptotic process</i>
	GO:0060548	<i>negative regulation of cell death</i>
	GO:0043069	<i>negative regulation of programmed cell death</i>

Bei der Betrachtung der **Abbildung 17** fällt auf, dass in allen drei untersuchten Signalwegen Genexpressionsregulationen durch die Herabsetzung der IL-16-Expression in den Myelomzellen stattgefunden haben. Innerhalb des PI3-Kinase-Signalwegs löste der Verlust der IL-16-Expression eine prägnante Modulation der Genaktivität von insgesamt 34 Genen aus (**Abbildung 17A**). Auffallend dabei war die Herunterregulierung von Genen, die überwiegend an der Proliferationsförderung bzw. Apoptosehemmung beteiligt sind. Für viele dieser Gene ist eine Mitwirkung sowohl in dem einen als auch in dem anderen biologischen Prozess beschrieben (mit einem grauen Rahmen gekennzeichnet). In der starken Minderheit befinden sich vereinzelt herunterregulierte Proliferationsinhibitoren und das pro-apoptotische Gen der Caspase-9. Zudem wurden die Gene zweier Wachstumshemmer durch den IL-16-Knockdown aktiviert. Ebenfalls wurde die Hochregulation der Expression eines anti-apoptotischen Gens beobachtet. Allgemein sprechen die Daten dafür, dass IL-16 durch Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs den Fortbestand der Zelle sichert, indem es sowohl das Zellwachstum begünstigt, als auch den Zelltod verhindert.

Der zweite eruierte Signalweg war die Aktivierungskaskade des Transkriptionsfaktorkomplexes NF κ B. Dieser Signalweg hat neben der Proliferationsförderung eine große Bedeutung in der Regulation der Immunantwort und des Zelltodes. Eine übersteuerte Immunreaktion mit einhergehender Inflammation begünstigt wiederum die Tumorprogression. IL-16 scheint diesen Signalweg in Myelomzellen maßgeblich zu beeinflussen. Die Hälfte der 84 erfassten Gene erfuhr eine Reduktion ihres Expressionsprofils (**Abbildung 17B**). Dem oberen Quartil der regulierten Gene wurde einheitlich eine pro-proliferative Wirkung zugesprochen, und zwar häufig in Kombination mit einem anti-apoptotischen Effekt. Unter den restlichen regulierten Genen befanden sich weitere Gene mit einer Doppelfunktion, denen teilweise auch gleichzeitig anti- und pro-apoptotische Bedeutung oder proliferationsunterstützende und zelltodvermittelnde Wirkungen zugesprochen wurden (mit einem grauen Rahmen gekennzeichnet). Ein wachstumshemmendes Gen war ebenfalls herunterreguliert. Insgesamt vermittelten die Daten den Eindruck, IL-16 moduliert für seine wachstumsfördernde Wirkung auch den NF κ B-Signalweg und nutzt jenen ferner für die simultane Regulation von Zelltod und Zellüberleben.

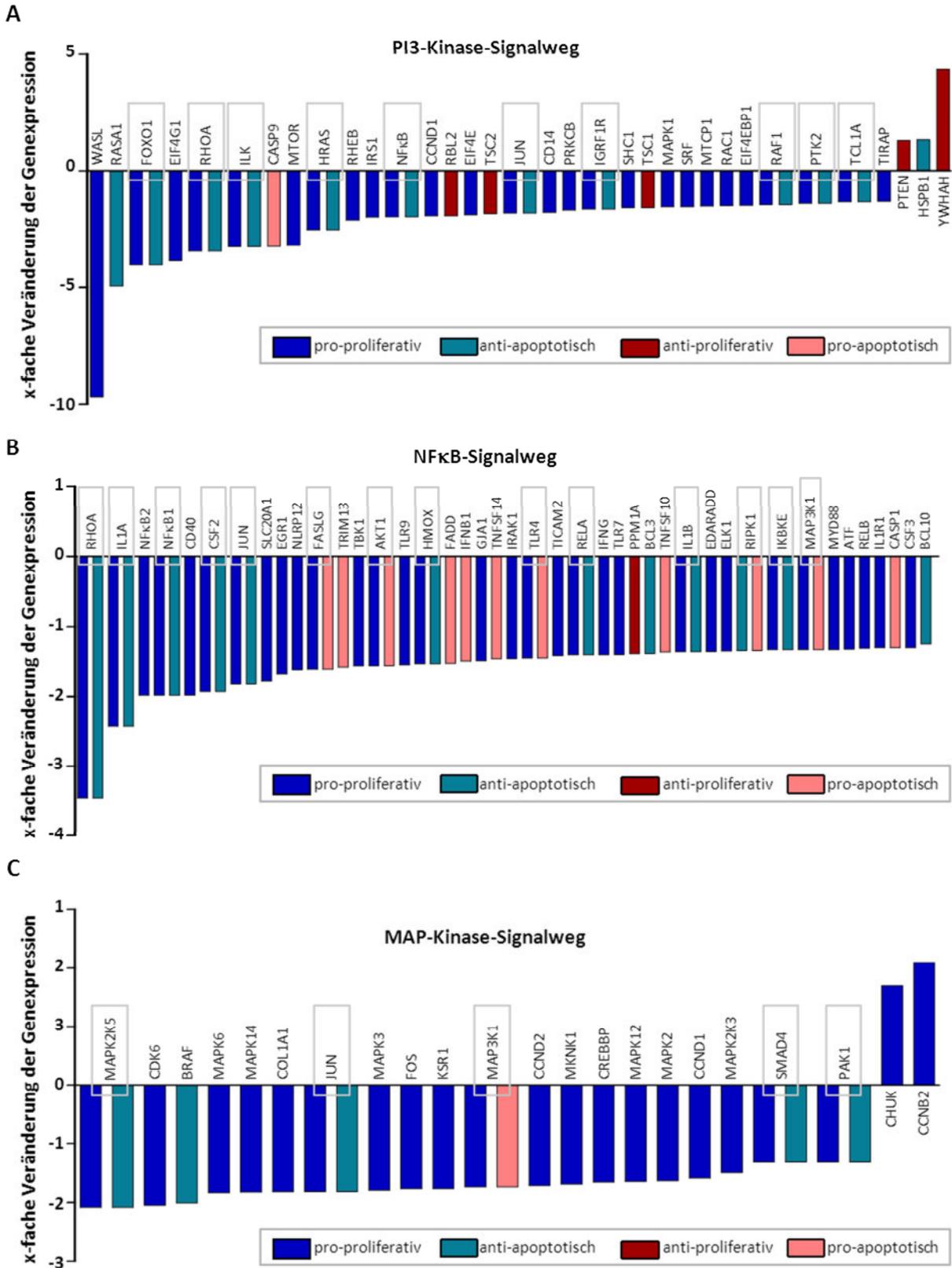


Abbildung 17: Einfluss von Interleukin-16 auf verschiedene Proliferationssignalwege

Dargestellt sind die Ergebnisse von q-RT-PCR-basierten Expressionsanalysen des (A) PI3-Kinase-Signalwegs, (B) NFκB- Signalwegs und des (C) MAP-Kinase- Signalwegs von IL-16-negativen Zellen. Es wird die x – fache Regulation gegenüber den Kontrollzellen angegeben, deren physiologische IL-16-Expression nicht behindert war. Sowohl die Versuchsgruppe, als auch die Kontrollgruppe hatten einen Stichprobenumfang von n = 3.

Letztlich wurde überprüft, ob der IL-16-Knockdown ebenfalls eine Repression des MAP-Kinase-Signalwegs zur Folge hatte. Dieser Pathway umfasst mehrere Signalkaskaden, die alle nach einem ähnlichen Transduktionsschema verlaufen. Es werden viele physiologische Prozesse über den MAP-Kinase-Signalweg gesteuert, insbesondere aber das Zellwachstum, die Proliferation und die Regulation des Zellzyklus. Die hier durchgeführten Expressionsanalysen zeigten eine Repression des Signalweges nach dem Verlust von IL-16 (**Abbildung 17C**). Insgesamt ist die Expression von 20 Genen herunterreguliert und bei zwei Genen aktiviert. In der Gruppe der herunterregulierten Gene waren fast ausschließlich pro-proliferative Kandidaten zu finden. Teilweise wurde diesen auch eine überlebensfördernde Wirkung zugesprochen, in einer Ausnahme war die proliferative Eigenschaft des Gens mit einer pro-apoptischen Charakteristik verknüpft. Den zwei aktivierten Genen wird ebenfalls eine progressive Funktion innerhalb des Wachstums- und Teilungsprozesses einer Zelle zugesprochen. Was für einen wachstumshemmenden Effekt von IL-16 hindeuten würde. Da die zwei hochregulierten Gene jedoch einer Vielzahl von inaktivierten Genen gegenübersteht, die den experimentell beobachteten proliferativen Effekt von IL-16 stützen, scheint IL-16 auch die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade zur Funktionsentfaltung zu nutzen.

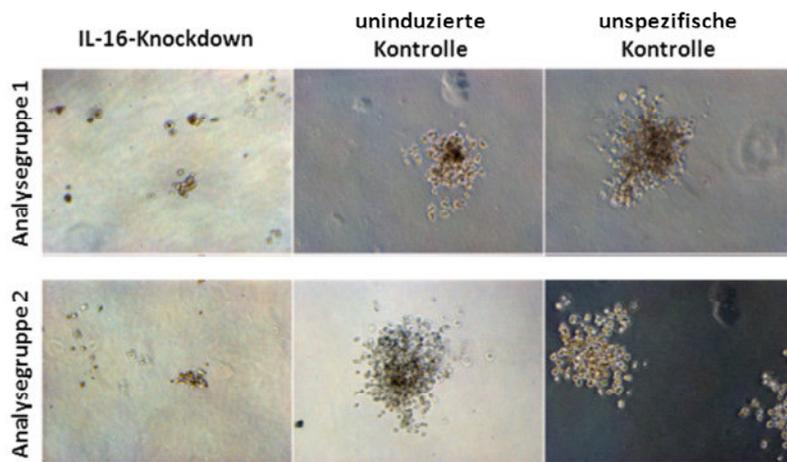
Da alle drei Signalwege in IL-16-negativen Zellen inaktiver sind, als in den IL-16-positiven Kontrollzellen, deutet das auf einen übergeordneten Effekt von IL-16 hin, der grundsätzlich die Zellproliferation stimuliert, für den aber kein einzelner Signalweg verantwortlich zu sein scheint, sondern ein bisher unbekannter Mechanismus aktiviert wird, der mehrere Signalwege anspricht.

3.3.4 Interleukin-16 unterstützt den Selbsterneuerungsprozess klonaler Vorläuferzellen des Multiplen Myeloms

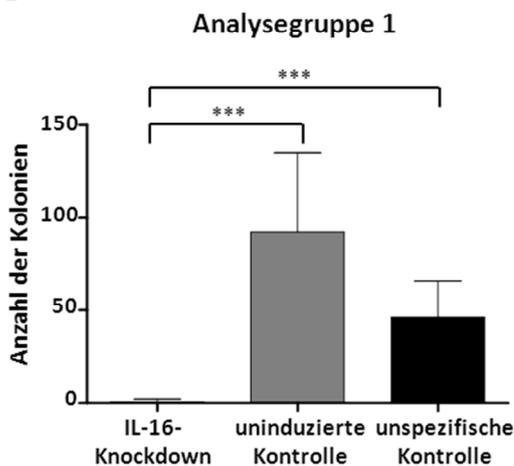
Seit einigen Jahren kursiert in Fachkreisen die These, neben dem Phänotyp der malignen Plasmazelle existieren sogenannte Myelomstammzellen, die nach vorerst erfolgreicher, antitumoraler Therapie das Rezidiv verursachen. Diese Vorläuferzellen besitzen die Eigenschaft der Selbstregeneration und haben im Gegensatz zur differenzierten malignen Plasmazelle das Potential zum klonalen Wachstum.^{122,130,308,309} Im Folgenden sind die Ergebnisse eines *Colony Formation Assays* beschrieben, mithilfe dessen geprüft wurde, ob der IL-16-Knockdown neben der Proliferation der malignen Zellen ebenfalls das Herauswachsen einer kolonieformierenden Vorläuferzelle erschwert. Bei der mikroskopischen Betrachtung

wurde der Unterschied zwischen den IL-16-negativen Zellen und den beiden Kontrollzellen direkt ersichtlich (**Abbildung 18A**). In den Knockdown-Zelllinien beider Analysegruppen lagen fast ausschließlich nur Zelltrümmer oder wenige Minikolonien einer Größe von ca. zehn Zellen vor. In den Kulturen der Kontrollzellen konnte hingegen die Herausbildung von Zellkolonien deutlich beobachtet werden.

A



B



C

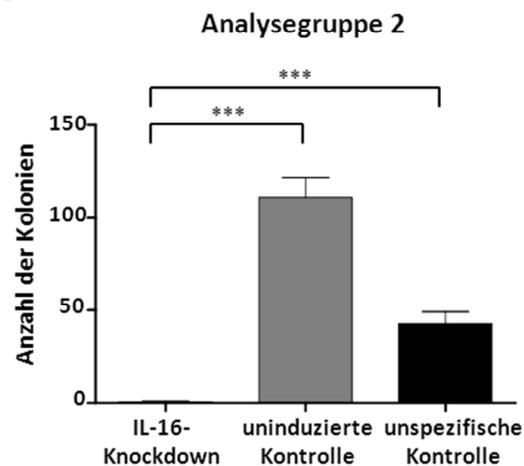


Abbildung 18: Die Beeinflussung von Interleukin-16 auf die Kolonieformung der Myelomzellen

Zur Erfassung des Potentials zum klonalen Wachstum wurden die Zellen 14 Tage in zähflüssigem Medium kultiviert. (A) Das Herausbilden von Kolonien wurde mikroskopisch verfolgt. (B) Am Ende des Versuchs wurden die gebildeten Kolonien ausgezählt. Eine Zellanhäufung von > 40 Zellen wurde als Kolonie gewertet. Der Versuch wurde sechsmal unter Gleichhaltung der Bedingungen durchgeführt. Die Mittelwerte sind in Höhe der Säulen angegeben. Der Fehlerbalken bildet die Standardabweichung ab. Die Berechnung der Signifikanzniveaus erfolgte über den gepaarten t-Test: (B): IL-16 k.d. vs. unind. Kontrolle: rel. Δ : -99,3 %, $p < 0,0001$; IL-16 k.d. vs. unsp. Kontrolle: rel. Δ : -98,7 %, $p < 0,0001$; (C): IL-16 k.d. vs. unind. Kontrolle: rel. Δ : -99,5 %, $p < 0,0001$; IL-16 k.d. vs. unsp. Kontrolle: rel. Δ : -98,8 %, $p < 0,0001$

Beide Analysegruppen wiesen eine signifikante Reduktion des klonalen Wachstums in den Myelomzellen mit herabgesetzter IL-16-Expression (**Abbildung 18B und C**). Im Vergleich zur

uninduzierten Kontrolle wurde die Befähigung zum klonalen Wachstum um ca. 99 % reduziert, verglichen mit der unspezifischen Kontrolle betrug die Reduktion ca. 98 %.

Jedoch zeigte auch die unspezifische Kontrolle eine deutliche Reduktion der Koloniebildung im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle. Vermutlich ist dieser Effekt auf die Behandlung mit Doxycyclin zurückzuführen. In einem hier nicht dargestellten Ansatz wurden Zellen der unspezifischen Kontrolle einmal mit und einmal ohne Doxycyclinbehandlung untersucht. Die unbehandelten Zellen wiesen ca. 20 % mehr Kolonien auf (Daten nicht gezeigt).

Die Beobachtung, dass der IL-16-Entzug das klonale Wachstum komplett unterbindet, wird dadurch jedoch nicht erschüttert, da dieser Effekt weitaus stärker war.

3.3.5 Interleukin-16 hat keine maßgebliche Bedeutung für den programmierten Zelltod

Die Expressionsprofile der Microarray-Analysen deuteten auf einen möglichen Beitrag von IL-16 auf ein erhöhtes Zellsterben hin. Anhand von Genaktivitätsstudien lassen sich Tendenzen ableiten, die in weiterführenden Analysen überprüft werden müssen. Daher wurde nun funktionell geprüft, ob IL-16 eine Bedeutung für die Einleitung oder Verhinderung des Zelltods einnimmt.

Ein durchflusszytometrisches Apoptose-Nachweisverfahren lieferte darüber Aufschluss. Zur Generierung valider Daten wurde für alle Durchführungen das in **Abbildung 19** dargestellte Gatingschema verfolgt. Wie gewohnt wurde ein Doublettenausschluss vorgenommen. Anstelle der Eingrenzung der vitalen Zellen wurden diesmal alle Zellen für die Analyse selektiert. Ausgeschlossen wurden lediglich die Zelltrümmer. Mithilfe einer Zweifachfärbung konnten die Zellen in vier Gruppen unterteilt werden. Die doppeltnegative Population entsprach den viablen bzw. lebenden Zellen. Zellen, die ausschließlich für das Annexin-V Signal positiv waren, bildeten die Population der früh-apoptotischen Zellen. Die zuvor nach Innen gerichtete Asymmetrie der membranständigen Phospholipide ist in den Zellen, die sich im frühen Stadium der Apoptose befinden, bereits verloren gegangen. Noch ist die Membran jedoch nicht durchlässig für den Totfarbstoff, der freie Aminosäuren bindet. Im fortgeschrittenen Stadium der Apoptose nimmt die Permeabilität der Membran zu und die Zellen erscheinen doppelpositiv. Einfachpositive Zellen für den Totfarbstoff gelten als nekrotisch.

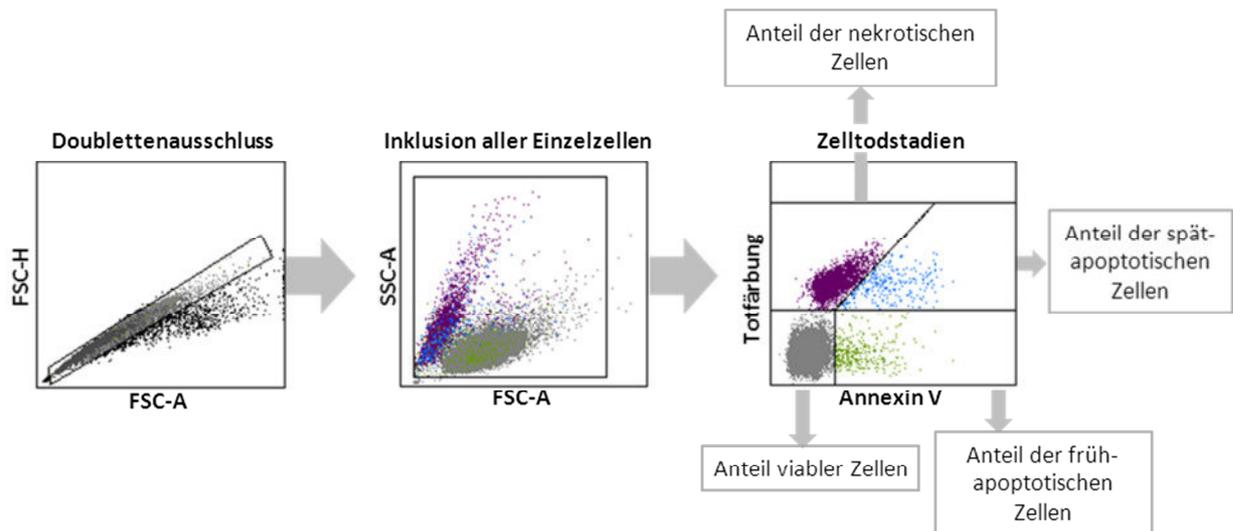


Abbildung 19: Gatingstrategie zur Ermittlung des Einflusses von Interleukin-16 auf den Zelltod

Zur durchflusszytometrischen Erforschung des Einflusses von Interleukin-16 auf den Zelltod wurden die relevanten Zellen nach dem abgebildeten Schema eingegrenzt und entsprechend ihrer Annexin V- und Totfärbung analysiert. Die jeweils im linksbefindlichen Dotplot selektierte Population wurde im rechtsliegenden Dotplot angezeigt. Doppelnegative Zellen sind viabel (graue Population). Zellen, die eine einfachpositive Färbung für Annexin aufweisen befinden sich im früh-apoptotischen Stadium (grüne Population). Doppeltpositive Zellen repräsentieren die spät-apoptotischen Zellen (blaue Population) und die einfachpositiven für den Totfarbstoff bilden die nektrotischen Zellen ab (auberginefarbene Population).

Die **Abbildung 20** veranschaulicht die Ergebnisse einer umfassenden Analyse zur Ermittlung des pro- und anti-apoptotischen Einflusses von Interleukin-16. Die Kategorisierung erfolgte in viable, nektrotische und apoptotische Zellen. Für die weiterführende Charakterisierung der apoptotischen Zellen wurde eine Klassifizierung in früh- und spät-apoptotische Zellen vorgenommen.

In beiden Analysegruppen (**Abbildung 20A und B**) wirkt es, als liege der Anteil viabler Zellen über den gesamten Zeitverlauf des Versuchs etwas über dem viablen Zellanteil der uninduzierten Kontrolle. Die Fehlerbalken lassen jedoch erahnen, dass nicht in jeder Versuchswiederholung dieses Ergebnis erzielt wurde, sondern vereinzelt der Anteil viabler Zellen in der IL-16-negativen Versuchsgruppe kleiner war, als bei den uninduzierten Zellen. Der Vergleich zur unspezifischen Kontrolle zeigt in beiden Analysegruppen eine nahezu identische Populationsgröße viabler Zellen. Demnach scheint IL-16 keinen markanten oder einheitlichen Einfluss auf den Anteil lebender, vitaler Zellen zu nehmen. Interessant hingegen ist die fortschreitende Dezimierung der nektrotischen Zellpopulation IL-16-negativer Zellen im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle. Die Abnahme der Nekrose verlief in beiden Analysegruppen signifikant, was auf einen maßgeblichen Effekt von IL-16 schließen lässt. Jedoch war diese Tendenz nicht konsistent zur unspezifischen Kontrollgruppe. In der ersten Analysegruppe schien der Anteil nektrotischer Zellen sogar durch die Herabregulierung der

IL-16-Expression über die Versuchszeit, mit Ausnahme an Tag 14, leicht erhöht. In der zweiten Analysegruppe hingegen nahm die Anzahl nekrotischer Zellen zunächst zu und im Langzeiteffekt nach Tag sieben wieder leicht ab, so dass annähernd das Niveau der Kontrolle erreicht wurde. Große Fehlerbalken deuten auch hier wieder auf schwankende Ergebnisse der Wiederholungen. Zusätzlich konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen identifiziert werden. Die Anzahl nekrotischer Zellen der uninduzierten Kontrolle war an Tag 7 (Analysegruppe 1 und 2) und Tag 14 (Analysegruppe 1) maßgeblich höher, als der jeweilige Anteil in der unspezifischen Kontrollgruppe. Da beide Kontrollen IL-16 exprimieren, kann der Effekt nicht auf das Cytokin zurückgeführt werden. Ob IL-16 die Nekrose von Zellen fördert, konnte anhand des Assays nicht zufriedenstellend belegt werden.

Bei der Betrachtung der allgemeinen Apoptose in der ersten Analysegruppe wird erneut die Widersprüchlichkeit der erhobenen Daten ersichtlich. In Relation zur uninduzierten Kontrolle ist die Zahl apoptotischer Zellen schon ab Tag 2 deutlich geringer, über den Zeitverlauf findet aber jedoch eine Annäherung statt, gleichwohl die IL-16-negativen Zellen an Tag 14 noch immer weniger apoptotische Zellen aufweisen. Relativ zur unspezifischen Kontrollgruppe war die Anzahl apoptotischer Zellen leicht erhöht, nahm im weiteren Verlauf kontinuierlich ab und erreichte am 14. Tag nach Knockdown-Induktion das Niveau der IL-16-exprimierenden Zellen. In der zweiten Analysegruppe verlief es wiederum etwas abweichend. Auch hier wurde im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle mit einer kleineren Population apoptotischer Zellen gestartet, die über den zeitlichen Verlauf zunahm und, anders als bei Analysegruppe 1, an Tag 14 stärker war, als die Kontrolle. Hingegen blieb die Anzahl IL-16-negativer, apoptotischer Zellen leicht hinter der unspezifischen Kontrolle zurück. Am Versuchsende waren die Populationen sehr ähnlich.

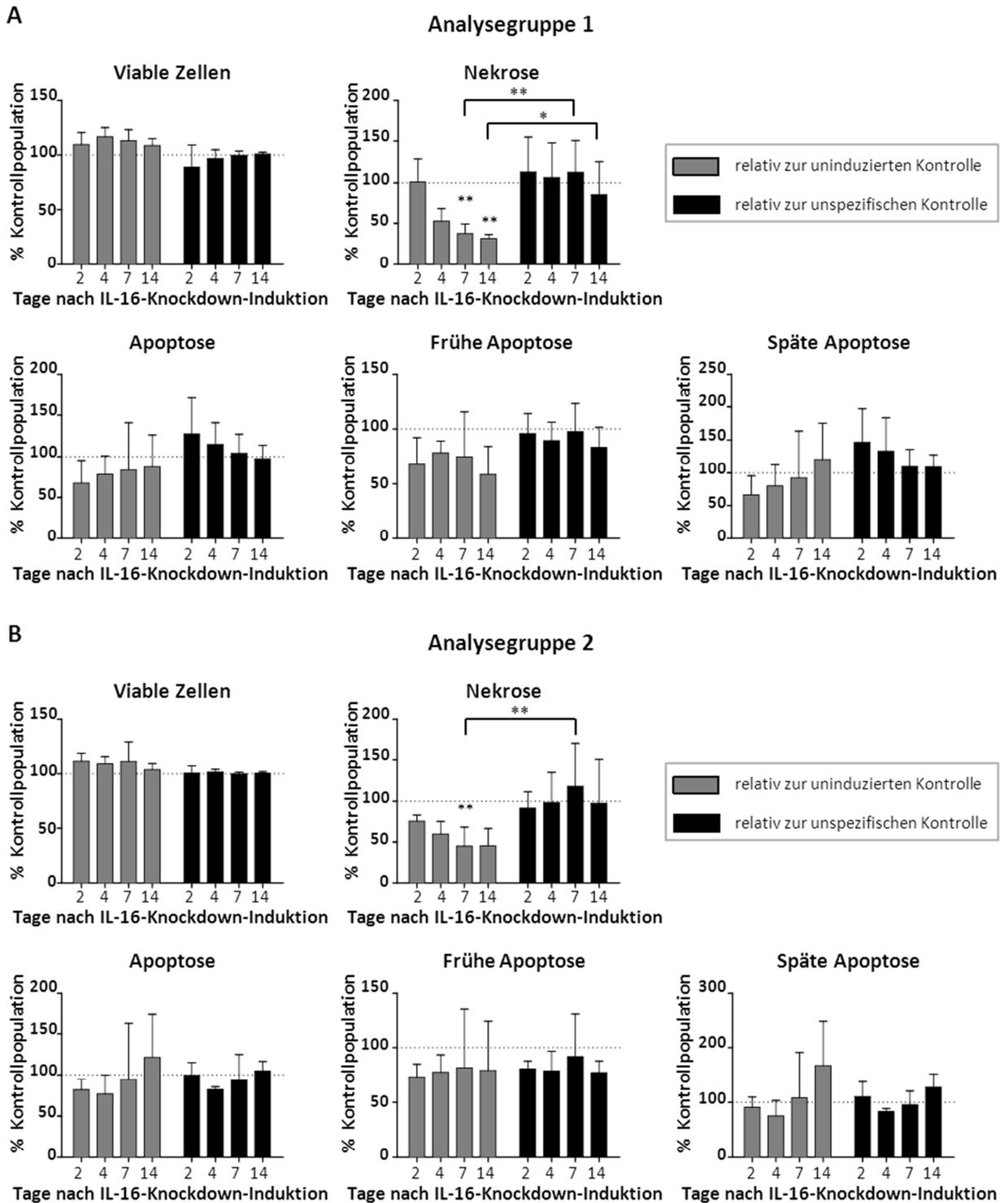


Abbildung 20: Ermittlung des Einflusses von Interleukin-16 auf den Zelltod

Es wurde eine durchflusszytometrische Apoptose-Analyse durchgeführt, bei welcher an verschiedenen Tagen nach der Induzierung des IL-16-Knockdowns die Populationsgröße der in den unterschiedlichen Zellstadien befindlichen Zellen ermittelt wurde. Untersuchungsobjekt bildeten zwei unabhängige Analysegruppen (A und B), die jeweils IL-16 negative Zellen sowie zwei verschiedene Kontrollzellen (uninduziert und unspezifisch) einschlossen. Dargestellt sind die relativen Populationsgrößen IL-16 negativer Zellen bezüglich der uninduzierten (graue Säulen) und der unspezifischen Kontrolle (schwarze Säulen). Die Versuchsreihen wurden insgesamt dreimal wiederholt. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte der Ergebnisse und die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken abgebildet. Die Berechnung der Signifikanzniveaus erfolgte über die Methode One-way ANOVA mit anschließendem Tukey's post-Test. (A) Nekrose: Knockdown vs. uninduz.: d7: $p = 0,0091$, d14: $p = 0,0042$; uninduz. vs. unspez.: d7: $p = 0,0065$, d14: $p = 0,0101$ (B) Nekrose: Knockdown vs. uninduz.: d7: $p = 0,0057$; uninduz. vs. unspez.: d7: $p = 0,0033$

Die Aufschlüsselung der apoptotischen Zellen in eine frühe und eine späte Phase ergab in allen Analyse- und Kontrollgruppen ein relativ einheitliches Bild. Die Anzahl der früh-apoptotischen Zellen innerhalb der Knockdown-Gruppe war stets geringer als die der jeweiligen Kontrolle. Die Population der späten Apoptose IL-16-negativer Zellen nahm tendenziell über die Dauer des Versuches zu. Am letzten Versuchstag war sie im Vergleich zu allen Kontrollzellen leicht bis deutlich erhöht. Statistisch signifikante Unterschiede wurden jedoch nicht identifiziert. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass IL-16 sowohl einen fördernden als auch hemmenden Einfluss auf den programmierten Zelltod sowie auf die Nekrose nehmen kann. Die Charakterisierung der spät-apoptotischen Phase deutet eher auf einen langfristigen pro-apoptotischen Effekt von IL-16 hin, bei dem die frühe Apoptose zeitlich stark limitiert wird und es unverzüglich zur Membranpermeabilisierung kommt, so dass die Zellen bei der Färbung nicht mehr in der frühen Phase abgefangen werden können.

Insgesamt ließ sich keine einheitliche Tendenz des Beitrags von IL-16 auf das Zellsterben ableiten. Der durch die Microarray-Analysen postulierte biologische Effekt, IL-16 fördere das Zellsterben, wurde funktionell nicht bestätigt.

3.3.6 Interleukin-16 nimmt positiven Einfluss auf die Viabilität der Myelomzellen

Zusätzlich zum proliferationsfördernden Einfluss wurde anhand der Microarray-Analyse ein positiver Beitrag von IL-16 auf die Zellviabilität postuliert, der ebenfalls funktionell validiert wurde. Jenes erfolgte mithilfe des MTT-Assays, welcher auf der Verwendung des membrangängigen Tetrazoliumsalses basiert, das in einer Redoxreaktion mit NADH, NADPH oder mitochondrialen Dehydrogenasen reduziert wird. Die Reduktionsstärke ist ein Maß der metabolischen Aktivität und korreliert positiv mit der Viabilität der Zellen. Sie erlaubt einen Vergleich aller lebenden Zellen bezüglich ihrer allgemeinen Fitness.

Zur Darstellung der Viabilitätsveränderungen durch die Herunterregulierung von Interleukin-16 wurde die absolute Differenz der metabolischen Aktivität IL-16-negativer Zellen und IL-16-exprimierender Zellen zum gegebenen Zeitpunkt berechnet. In beiden Analysegruppen wurden Vergleiche zur uninduzierten Kontrolle und zur unspezifischen Kontrolle angeführt (**Abbildung 21**).

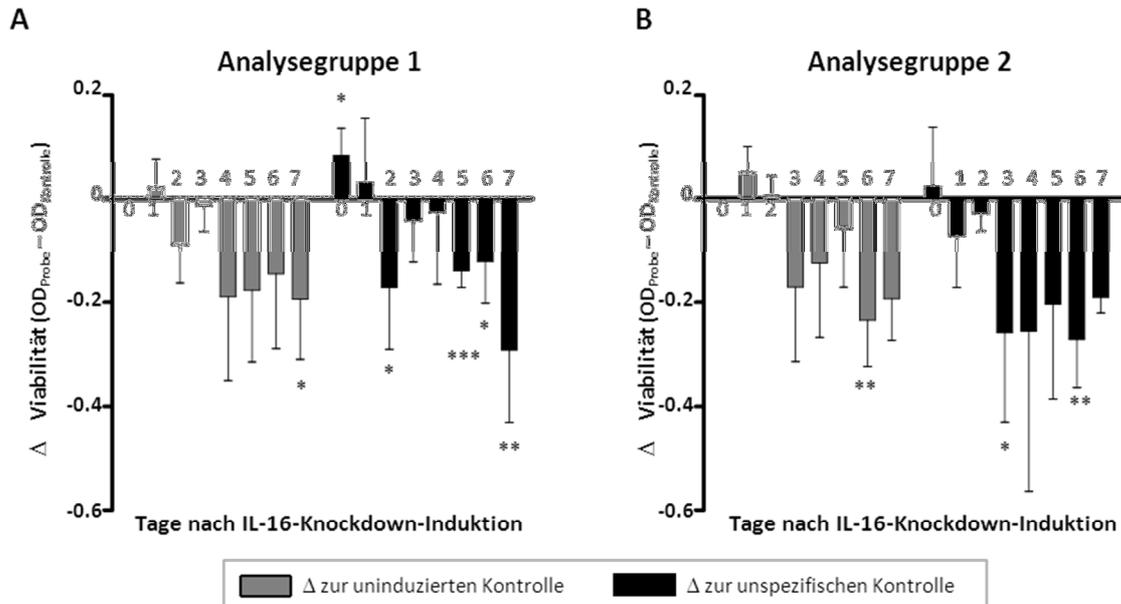


Abbildung 21: Einfluss von Interleukin-16 auf die Zellviabilität

Zur Erforschung der Zellviabilität wurden Zellen in einer genau definierten Zellzahl in einer 96-Well Platte ausgesät. Unmittelbar nach dem Ausplattieren wurde den Zellen MTT beigelegt, dessen metabolische Umsetzung colorimetrisch verfolgt werden kann. Je höher dabei die Farbentwicklung war (OD, *optical density*), desto viabler waren die Zellen. Ergab sich eine negative Differenz zwischen IL-16-Knockdown Zellen und Kontrollzellen, so stand das für eine Abnahme der Zellviabilität in der Versuchsgruppe. Diese Differenz wurde zur uninduzierten Kontrolle (graue Säulen) und zur unspezifischen Kontrolle (schwarze Säulen) innerhalb einer Versuchsreihe an verschiedenen Messtagen gebildet. Für die Messung wurden zwei unabhängige Analysegruppen (A und B) herangezogen und die Versuchsreihe jeweils sechsmal wiederholt. Die Mittelwerte sind durch die Säulen, die Standardabweichung durch die Fehlerbalken abgebildet. Die Berechnung der Signifikanzniveaus erfolgte über die Methode One-way ANOVA mit anschließendem Tukey's post-Test. (A) $\Delta_{\text{uninduz.}}$: Tag 7: $p = 0,0216$; $\Delta_{\text{unspez.}}$: Tag 0: $p = 0,0251$; Tag 2: $p = 0,0379$; Tag 5: $p = 0,00003$; Tag 6: $p = 0,0293$; Tag 7: $p = 0,0076$; (B) $\Delta_{\text{uninduz.}}$: Tag 6: $p = 0,0031$; $\Delta_{\text{unspez.}}$: Tag 3: $p = 0,0312$; Tag 6: $p = 0,0019$

Zum Zeitpunkt der Induktion (Tag 0) entstammten die Versuchszellen und die Kontrollzellen (uninduziert) der gleichen Zellkultur und zeigten somit eine identische metabolische Aktivität. Im Vergleich zur unspezifischen Kontrolle waren diese Zellen an dem Versuchstag metabolisch aktiver. Einen Tag später näherten sich die Zellen innerhalb der ersten Analysegruppe bzgl. ihrer Viabilität etwas an. Ab dem zweiten Tag nach der Induktion des Knockdowns (IL-16-Proteinmenge ca. 50 %, siehe **Abbildung 8**) war die metabolische Aktivität im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen stark reduziert. An Tag 3 schmälerte sich der Unterschied kurzweilig, bevor an Tag 4 (uninduziert) bzw. Tag 5 (unspezifisch) ein starker Verlust der Viabilität IL-16-negativer Zellen zu verzeichnen war, der bis zum Versuchsende am siebten Tag anhielt (**Abbildung 21A**). Innerhalb der zweiten Analysegruppe wurde diese Tendenz bestätigt. Der Vergleich zu den uninduzierten Zellen zeigt, dass die Knockdown-induzierten Zellen diesmal bis Tag 2 metabolisch aktiver sind, bevor die Viabilität deutlich unter die der Kontrollzellen abfällt. Auch hier schmälert sich die Differenz zeitweilig, mit einem erneuten signifikanten

Verlust an Tag 6 und 7. Wurde der Vergleich zur unspezifischen Kontrolle angeführt, ließ sich eine kontinuierlich negative Differenz ab Tag 1 festhalten. Ab Tag 3 war die Viabilität maßgeblich reduziert, was bis zum Versuchende anhielt (**Abbildung 21B**).

Die hier angeführten Viabilitätsmessungen belegen den zuvor aus Expressionsprofilen abgeleiteten Einfluss von IL-16 auf die Viabilität. Dabei bestätigen die funktionellen Analysen, dass sich die Präsenz von IL-16 positiv auf die Zellviabilität auswirkt.

Zusammenfassend liefern die hier dargestellten Ergebnisse neuartige Erkenntnisse für die Charakterisierung von IL-16 im Multiplen Myelom. Es erfolgte erstmalig eine differenzierte Beschreibung der Expressionsmuster und funktionellen Bedeutung von IL-16 bei malignen Erkrankungen. Es wurde gezeigt, dass Myelomzellen IL-16 überexprimieren, die Expression des Cytokins zyklisch reguliert ist und Myelomzellen verglichen mit nicht-malignen Lymphozyten eine aberrante IL-16-Sekretion aufzeigen. Erstmals konnte gezeigt werden, dass Myelomzellen eine konstitutive Caspase-3-Aktivität besitzen, in der möglicherweise der stimulusunabhängige, permanent aktive Prozessierungs- und Sezernierungsmechanismus begründet liegt. Weiterhin wurden eine autokrine Wachstumsprogression sowie eine positive Beeinflussung der Zellviabilität durch IL-16 nachgewiesen. Den biologischen Prozess des Zellsterbens beeinflusst IL-16 in den Myelomzellen nicht. Interessanterweise führte die Reduktion der IL-16-Expression zum vollständigen Verlust der Fähigkeit des klonalen Wachstums.

4. Diskussion

Das Multiple Myelom ist eine bisher unheilbare maligne Erkrankung des Knochenmarks, die mit sehr schlechten Überlebenschancen für die Betroffenen assoziiert ist. Wie die meisten Tumorentitäten sind die Herausbildung und das progressive Wachstum des Multiplen Myeloms auf eine tumorunterstützende Mikroumgebung angewiesen. Trotz initialer Tumorüberwachung durch das Immunsystem gelingt es den neoplastischen Zellen, einer anti-tumoralen Immunantwort zu entkommen. Sie rekrutieren eine immunsuppressive Mikroumgebung aus verschiedenen Stroma- und Immunzellpopulationen, um sich zu klinisch apparenten Tumoren formieren zu können.^{310–312} Im Folgenden wird basierend auf den generierten Ergebnissen und anlehnend an die aktuelle Literatur diskutiert, inwiefern das chemotaktisch wirkende Cytokin IL-16 an der Progression des Multiplen Myeloms beteiligt ist. In den vergangenen Jahren wurde vermehrt über eine Korrelation von erhöhten IL-16-Serumkonzentrationen und fortgeschrittenen Krankheitsverläufen verschiedenster Neoplasien berichtet. Da es sich jedoch um ein sehr junges Forschungsfeld handelt, ist bisher kaum etwas über die Ursachen und die Bedeutung von IL-16 im onkologischen Zusammenhang bekannt. Mit der vorliegenden Arbeit konnten nun erstmalig einige dieser Fragen im Kontext des Multiplen Myeloms beleuchtet werden.

4.1 Aberrante Interleukin-16-Expression und -Sekretion der malignen Plasmazellen sind verantwortlich für die hohen Interleukin-16-Serumkonzentrationen im Multiplen Myelom

4.1.1 Myelomzellen exprimieren verstärkt Interleukin-16

Wichtige Hinweise auf einen möglichen Beitrag von IL-16 auf die Pathogenese des Multiplen Myeloms lieferten die IL-16-Expressionsstudien. Neun von zehn Myelomzelllinien zeigten deutliche IL-16-Genaktivitäten mit teilweise höheren IL-16-mRNA-Leveln, als die stark aktivierten T-Lymphozyten, welche als Positivkontrolle eingesetzt wurden (**Abbildung 1A**). Insbesondere CD8⁺-T-Zellen sind mehrfach für ihre intensive IL-16-Expression beschrieben worden.^{136,137,151} Die hier angestellten Beobachtungen der stark aktivierten IL-16-mRNA-Expression deckten sich mit den Ergebnissen aus anderen Studien innerhalb unserer Arbeitsgruppe. Atanackovic *et al.* zeigten beispielsweise, dass die IL-16-mRNA-Expression in isolierten mononukleären Zellen des Knochenmarks (BMMCs, *bone*

marrow mononuclear cells) von der Anzahl infiltrierender Myelomzellen abhängt. Je stärker die Tumorlast im Knochenmark war, desto höher war die detektierte IL-16-mRNA-Expression. Dies deutete stark auf eine IL-16-Überexpression in den Myelomzellen hin,²⁶⁰ was nun mit der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte.

Die Ergebnisse der Transkriptionslevel spiegelten sich ebenfalls in der Pro-IL-16-Proteinsyntheserate wider. Auch hier wiesen neun von zehn Zelllinien hohe IL-16-Proteinlevel auf. Einige Myelomzellen zeigten sogar eine höhere IL-16-Expression verglichen mit den aktivierten T-Lymphozyten (**Abbildung 1B**). In anderen Studien, in denen primäre Zellen getestet wurden, konnte analog dazu auf Einzelzellebene gezeigt werden, dass neoplastische Plasmazellen deutlich mehr intrazelluläres IL-16 exprimieren, als die normalen Plasmazellen von pathologisch unauffälligen Spendern.²⁶⁰ Die massive Überexpression von IL-16 in malignen Plasmazellen erklärt möglicherweise die Probleme bei der Erzeugung eines effizienten IL-16-Knockdowns. Zahlreiche Systeme wurden getestet, doch die gewünschte Herunterregulierung der IL-16-Genexpression blieb in den meisten Fällen aus, obwohl die Systeme und Sequenzen vom Hersteller validiert wurden. Häufig konnten nur Knockdown-Effizienzen von 10 – 30 % erzielt werden. Letztlich konnte nur eine von knapp 20 Sequenzen einen zufriedenstellenden IL-16-Knockdown hervorrufen (**siehe Kapitel 3.2.1**).

Mithilfe einer durchflusszytometrischen Analyse wurde der Anteil IL-16-positiver Myelomzellen innerhalb einer Zellkultur ermittelt. Bei fast allen Zelllinien erwiesen sich mehr als 90 % der Zellen positiv für das Protein, teilweise jedoch mit unterschiedlich starker Expression innerhalb einer Zelllinie (**Abbildung 2B**). Da die Präsenz von IL-16 sowohl im malignen als auch im nicht-malignen pathologischen Kontext häufig mit einer fortgeschrittenen Pathogenese assoziiert ist,^{313,314} könnte die verschieden ausgeprägte IL-16-Expression innerhalb der Population auf eine unterschiedliche Aggressivität der Tumorzellen hindeuten.

Neben der Überexpression und dem aberranten Sekretionsverhalten deutete auch die energieaufwendige, zyklisch regulierte Genaktivität auf eine tumorfördernde Funktion von IL-16 hin (**Abbildung 3**). In Säugetieren gibt es unzählige diversifizierte, zirkadiane Systeme, die ge- und entkoppelt vom 24 h-Tagesrhythmus, Lichteinflüssen oder der Zellteilung ablaufen und u. a. durch den Transkriptionsfaktor CLOCK (*circadian locomotor output cycles kaput*) vermittelt werden.^{315–318} Ob die oszillierenden IL-16-mRNA-Level in der CLOCK-Genexpression begründet liegen, oder andere Regulationsmechanismen eine Rolle spielen ist noch ungewiss. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass beispielsweise auch die Herausbildung

einer Immunantwort durch die zirkadiane CLOCK-Genexpression beeinflusst wird. Auffällig waren zunächst oszillierende Verschiebungen in der Anzahl verschiedener Immunzellsubpopulationen.^{319–321} Seither sind einige molekulare Ziele beschrieben, die durch die CLOCK-Genregulation betroffen sind. Dazu zählen beispielsweise der Toll-like-Rezeptor 9, die T-Zellsignalkinase ZAP70 und der Transkriptionsfaktor NFκB.^{322–325}

Ausschlaggebend für die Funktionalität des CLOCK-Transkriptionsfaktors sind posttranslationale Modifikationen sowie Interaktionen mit co-Aktivatoren. So ist beispielsweise die Interaktion mit dem co-Aktivator CREBBP essentiell.³²⁶ Da auch der IL-16-Promotor eine Sequenz zur Bindung des CREBBPs enthält und CREBBP bereits als co-Faktor für die IL-16-Expression identifiziert wurde,¹⁴⁹ ist eine CLOCK-vermittelte, periphere zirkadiane Regulation denkbar. Insbesondere bei der Expression von Cytokinen wird eine zirkadian regulierte Synthese vermutet^{325,327} und wurde in Makrophagen bereits für TNF-α und IL-6 nachgewiesen.³²⁸

Das IL-16-Expressionsprofil für gesunde Plasmazellen ist noch nicht beschrieben. Ob die zyklische Rhythmik der IL-16-Expression innerhalb der Myelomzellen pathologisch bedingt ist, bleibt demnach offen. Für das kolorektale Karzinom ist jedoch bereits bekannt, dass eine Überexpression der CLOCK Gene die Tumorgenese begünstigen kann, indem tumorfördernde Gene vermehrt und in kürzeren Rhythmen transkribiert werden.^{329,330} Da primäre Myelomzellen signifikant höhere IL-16-mRNA- und -Protein-Level aufweisen, als nicht-maligne Plasmazellen,²⁶⁰ könnte diese Hypothese auch für das Multiple Myelom gelten.

- **Fazit**

Die IL-16-Überexpression in primären und kultivierten Myelomzellen gegenüber nicht-malignen Zellen lässt auf einen Beitrag des Cytokins bei der Tumorprogression schließen.

4.1.2 Myelomzellen produzieren und sekretieren konstitutiv bioaktives Interleukin-16

Für alle bisher charakterisierten IL-16-positiven Zellen, z. B. CD8⁺-T-Lymphozyten und CD4⁺-T-Lymphozyten^{151,161,162}, Mastzellen¹⁶³, Eosinophile¹⁶⁴, dendritische Zellen¹⁶⁵, Makrophagen¹⁶⁶, Epithelzellen^{169,170} oder Fibroblasten¹⁷¹, wurde eine aktivierungsabhängige Sekretion des Cytokins nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Zellen auch befähigt sind, ohne externen Stimulus konstitutiv bioaktives IL-16 zu sekretieren. Zellkulturüberstände

wiesen massive IL-16-Konzentrationen auf, die mittels ELISPOT, ELISA und Immunoblot-Analysen nachgewiesen wurden (**Abbildung 4**). Dahingegen war in Versuchen mit nicht-malignen Immunzellen das reife IL-16 selbst nach einer Zellstimulation anhand physikochemischer Nachweismethoden (z. B. Immunpräzipitation und Western Blot) nur selten detektierbar.^{148,216} Somit schienen die für gesunde Zellen üblichen Kontrollmechanismen in der neoplastischen Plasmazelle entartet zu sein, was zu einer verstärkten Sekretion im malignen Phänotyp führt. Der relative Anteil IL-16-exprimierender Zellen korrelierte dabei streng mit der Anzahl IL-16-sekretierender Zellen (**Abbildung 2B**; **Abbildung 4A**). Die Expression mündet demnach direkt in eine Sekretion.

Die Grundvoraussetzung der konstitutiven Sekretion des Cytokins ist jedoch, dass eine permanente Prozessierung des Vorläuferproteins stattfindet. Bisher war zum Spaltmechanismus von Pro-IL-16 in Zellen des Multiplen Myeloms nichts bekannt. Anlehnend an die Prozessierungsstudien von IL-16 in T-Lymphozyten, welche eine Beteiligung von Caspase-3 bei der Spaltung von Pro-IL-16 hervorbrachten,¹⁵³ wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, inwiefern diese Protease bedeutend für die Prozessierung von Pro-IL-16 im Multiplen Myelom ist. Zum einen war das Enzym in der Lage, das von den Myelomzellen produzierte Pro-IL-16 zu schneiden und weiterhin korrelierte die Menge des abgespalteten C-terminalen Fragments positiv mit der Aktivität der Caspase-3 (**Abbildung 5B,C**). Jenes lässt stark auf die Mitwirkung der Caspase-3 bei der physiologischen Spaltung von Pro-IL-16 schließen. Da in dem Fall nur Korrelationen, jedoch keine Kausalitäten nachgewiesen wurden, ist die Beteiligung weiterer Proteasen ebenfalls möglich.

Ob tatsächlich die Caspase-3 die Prozessierung von Pro-IL-16 übernimmt, sollte in einem lentiviralen, FRET-basierten *Life Cell Imaging* verifiziert werden. Angrenzend an den Beobachtungen der zyklischen Regulation der IL-16-mRNA-Expression sowie der Proteinbiosynthese, sollte zusätzlich bei dem FRET-basierten Versuchsansatz überprüft werden, ob ebenfalls die Prozessierung von Pro-IL-16 einen determinierten kinetischen Verlauf einnimmt. Dazu wurde das Donorfluoreszenzprotein Turquoise (CFP) über ein Linkerpeptid mit dem Akzeptorfluoreszenzprotein Venus (YFP) fusioniert. Für die Aminosäuresequenz des Linkerpeptids wurde die postulierte Caspase-3-Schnittstelle des Pro-IL-16 gewählt. Als Kontrollpeptide wurde die etablierte Caspase-3-Schnittstelle der Aminosäuresequenz DEVD (Positivkontrolle) sowie ein Linker unspezifischer Sequenz (Negativkontrolle) verwendet. Die Spaltung des Fusionsmoleküls führt zu einem Verlust der

räumlichen Nähe der Fluoreszenzproteine, was durch einen reduzierten FRET-Effekt visualisiert werden kann.³³¹ Die Klonierung, die lentivirale Verpackung und die Validierung des Systems wurde erfolgreich durchgeführt, jedoch ergaben sich Komplikationen nach der lentiviralen Transduktion der Myelomzellen. Es konnte kein stabiler Phänotyp erzeugt werden, der beide Fluoreszenzproteine CFP und YFP im gleichen molaren Verhältnis exprimiert. Wenige Zeit nach Transduktion konnte zwar die Expression beider Proteine nachgewiesen werden, doch nach wenigen Tagen der Selektion mit einem Antibiotikum verschob sich das Expressionsmuster deutlich. Die Produktion eines der beiden Proteine nahm stark ab, oder wurde komplett eingestellt. Bei mehrfachen Transduktionsrunden war keine Tendenz erkennbar, ob die Expression des CFPs oder des YFPs häufiger von der Expressionsabnahme betroffen war (Daten nicht gezeigt).

Dieser beobachtete Effekt ist vermutlich auf Prozesse der homologen Rekombination zurückzuführen, wodurch die lentiviral ins Genom integrierte cDNA-Sequenz der Fluoreszenzproteine wieder aus der genomischen DNA eliminiert wurde. Zum einen wird die homologe Rekombination durch die starken Sequenzhomologien von CFP und YFP sowie die Verwendung von YFP als Dimer begünstigt. Zusätzlich weisen die Zellen des Multiplen Myeloms drastisch erhöhte Aktivitäten ihrer homologen Rekombination auf.³³² Die Frage nach einer Regulation der Spaltung sowie der Validierung der Beteiligung von Caspase-3 an diesem Prozess bleibt demnach weiterhin offen und muss auf der Grundlage eines anderen Nachweissystems erfolgen. Eine Pro-IL-16-Spaltung durch die Caspase-3 kann in Myelomzellen weiterführend überprüft werden, in denen diese Protease herunterreguliert wurde. Eine kompetitive Hemmung der Caspase-3 mit klassischen Caspase-3-Inhibitoren ist aufgrund der massiven IL-16-Konzentrationen nicht zu empfehlen. Weiterhin könnte ein FRET-System etabliert werden, welches Donor- und Akzeptorpaare mit geringer Sequenzhomologie verwendet, um dadurch die Gefahr der homologen Rekombination drastisch zu reduzieren.

Weitere angeführte Experimente stützen die Hypothese, dass Caspase-3 bei der permanenten, stimulusunabhängigen Prozessierung und Sekretion des reifen IL-16 durch die Myelomzellen mitwirkt. Bei anderen Zelltypen, wie beispielsweise T-Lymphozyten oder Fibroblasten, bei denen die Sekretion von IL-16 stets an ein externes Aktivierungssignal geknüpft ist, geht die verstärkte Cytokinausschüttung mit einer Caspase-3-Aktivierung einher. Unstimulierte Zellen sekretieren weder IL-16 noch ist eine Caspase-3-Aktivierung erkennbar.^{333,334} In Myelomzellen

konnte eine basale Caspase-3-Aktivität detektiert werden, die nicht mit einem Zellsterben assoziiert war (**Abbildung 5D**). So geht in den malignen Plasmazellen die fortwährende Produktion und Sekretion des reifen C-terminalen Fragments von IL-16 mit einer inhärenten, spontanen Caspase-3-Aktivität einher. Darin liegen möglicherweise auch die hohen IL-16-Serumlevel begründet, die bei Patienten mit progressivem Multiplen Myelom sowie schlechten Überlebensprognosen nachgewiesen wurden.^{6,246,255} Nach der Prozessierung scheint das bioaktive IL-16 nur in begrenzten Mengen in der Zelle gespeichert zu werden, da nach Caspase-3-Induktion in den Myelomzellen ein unmittelbarer Anstieg der IL-16-Level im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden konnte, während das intrazelluläre C-terminale Fragment in einer der zwei gezeigten Zelllinien nur sehr schwach detektierbar war. Demnach scheint nicht nur der Prozessierungsmechanismus, sondern auch der Sezernierungsvorgang in den Tumorzellen dereguliert zu sein, denn in gesunden Zellen ist eine Speicherung von reifen IL-16 üblich.^{161–163}

- **Fazit**

Die starke, permanente Sekretion von bioaktiven IL-16 durch primäre und kultivierte Myelomzellen sowie die abnormalen, stimulusunabhängigen Prozessierungs- und Sekretionsmechanismen deuten massiv auf Deregulationen an verschiedenen Kontrollpunkten und eine IL-16-bedingte Tumorprogression hin.

4.2 Interleukin-16 beeinflusst signifikant die Tumorprogression des Multiplen Myeloms

4.2.1 Myelomzellen reagieren sensitiv auf den Entzug von Interleukin-16 mit einer Veränderung ihres Expressionsprofils

Die eben beschriebene Expressionsstudie sowie das ungewöhnliche Sekretionsverhalten begründeten die Notwendigkeit einer Überprüfung der funktionellen Bedeutung von IL-16 im malignen Phänotyp des Multiplen Myeloms. Anhand von genomweiten Expressionsstudien wurde ermittelt, inwiefern die Myelomzellen ihre Expressionsprofile verändern, sobald die IL-16-Expression unterbunden wird. Im Vergleich IL-16-positiver und IL-16-negativer Myelomzellen konnten differenziell regulierte Gene identifiziert werden. Bei der Plasmazytomzelllinie AMO-1 wurden 586 Gene durch den Entzug von IL-16 moduliert,

während bei der Zelllinie des symptomatischen Myeloms RPMI-8226 79 Gene differenziell moduliert wurden (Tabelle 8). Hier wird deutlich, dass das Plasmozytom, eine weit fortgeschrittene und aggressive Form des Multiplen Myeloms, sensitiver auf den Verlust von IL-16 reagiert, als das knochenmarkslokalisierte symptomatische Myelom. Diese Beobachtung stützt ein weiteres Mal die These, dass IL-16 nicht nur positiv zur Tumorprogression korreliert ist, sondern diese darüber hinaus auch fördert.

Innerhalb einer Proben­gruppe gab es teilweise starke Schwankungen in der Ausprägung der Regulation. Dadurch konnten sämtliche Gene mit gleicher Tendenz der Expressionsmuster, jedoch mit starker Varianz, den eng gefassten Signifikanzkriterien nicht entsprechen. Das zeugt u. a. von dynamischen epigenetischen Regulationen in den Myelomzellen, die neben der Genominstabilität für die Pathogenese des Multiplen Myeloms bezeichnend sind.^{15,16,27,335} Weiterhin unterschieden sich wahrscheinlich die Zusammensetzungen der Zellpopulation jeder Stichprobe etwas. Bei einer zufälligen Zellentnahme ist es sehr wahrscheinlich, dass sich bei einem Mal mehr Zellen in der G₁-Zellzyklusphase befanden, während bei einer anderen Zellentnahme beispielsweise der Anteil der G₂-Phasezellen höher war. Es ist bekannt, dass Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedlich auf physiologische Veränderungen reagieren bzw. per se unterschiedliche Expressionsprofile aufweisen.³³⁶ Für eine gefestigtere Aussage über die differenzielle Genregulierung durch IL-16 wäre eine höhere Gruppengröße sinnvoll gewesen. Allerdings stand nicht die Identifizierung von Kandidatengenen im Vordergrund, sondern die Generierung von Hinweisen auf den funktionellen Einfluss von IL-16 auf den malignen Phänotyp des Multiplen Myeloms. Um diesen aus den Modulierungen des Genexpressionsprofils ableiten zu können, wurden die hochsignifikant regulierten Gene genontologisch biologischen Prozessen zugeordnet. Um die Aussage der postulierten funktionellen Effekte zu stabilisieren, wurde das Panel um weitere regulierte Gene mit einem geringeren Signifikanzniveau erweitert, die in den Gesamtkontext eingegliedert wurden. Auf die Weise konnten folgende Effekte von IL-16 abgeleitet werden: Proliferations- und Viabilitätsförderung bei gleichzeitig erhöhten Apoptoseraten sowie der Hemmung der Zelldifferenzierung.

Für die Beantwortung der meisten Fragestellungen stellt die Methode des Microarrays lediglich eine Vorstufe dar, um eine grobe Tendenz zu identifizieren, sofern die Gruppenstärke sehr klein ist. Es handelt sich dabei um eine relativ fehleranfällige Methode. Unspezifische Amplifikationen bei der Herstellung von cRNA, präferenzielle Markierung bestimmter

Sequenzen, Cross-Hybridisierung und unspezifische Bindungen sind einige Beispiele dafür.³³⁷ Hergeleitete Effekte müssen aufgrund dessen proteinbiochemisch oder anhand funktioneller Assays bestätigt werden. Da bisher nichts über einen mechanistischen Beitrag von IL-16 auf die Tumorgenese bekannt ist, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Bestätigung anhand funktioneller Analysen.

- Fazit

Das Genexpressionsprofil von Myelomzellen wird durch eine verminderte IL-16-Expression moduliert. Die Auswirkungen unterscheiden sich bei den verschiedenen Krankheitsstadien qualitativ und quantitativ. Die postulierten biologischen Effekte von IL-16 im Multiplen Myelom sind Proliferations- und Viabilitätsförderung, kontrovers dazu die Erhöhung der Apoptoserate sowie die Hemmung der Zelldifferenzierung.

4.2.2 Interleukin-16 unterstützt die Proliferation und das Überleben von neoplastischen Plasmazellen

4.2.2.1 Interleukin-16 stimuliert autokrin das Wachstum der Myelomzellen und deren Viabilität

Die Ergebnisse der genomweiten Expressionsanalysen deuteten auf pleiotrope Effekte von IL-16 im Multiplen Myelom hin. Die funktionelle Validierung der aufgezeigten Tendenzen bestätigte die tumorprogressive Eigenschaft von IL-16.

Durch die Reduktion der IL-16-Expression wurde eine Replikations- und Wachstumsinhibierung der Myelomzellen induziert (**Abbildung 10**, **Abbildung 11**). Weiterhin wurde ein korrelativer Zusammenhang zwischen der Anzahl IL-16-sekretierender Myelomzellen innerhalb einer Population und der Replikationsfrequenz aufgedeckt (**Abbildung 12A**). Ebenfalls korrelierte das Teilungsverhalten der Myelomzellen mit den extrazellulären IL-16-Konzentrationen (**Abbildung 12B**). Diese Daten deuten stark auf einen autokrinen, aktivierenden und mitogenen Effekt von IL-16 hin. Zwei unterschiedliche Analysen zeigen auf, dass IL-16 insbesondere für den Übergang von der S-Phase in die G₂-Phase bedeutend ist. In Wildtyp-Myelomzellen ist die Expression von IL-16 signifikant erhöht (**Abbildung 16**) und eine Herunterregulierung von IL-16 führt zu einer starken Reduktion der G₂-Population mit einer unspezifischen, ausgleichenden Anreicherung in der G₀/G₁-Phase und der S-Phase (**Abbildung**

14). Über welchen Mechanismus das Cytokin die S-G₂-Transition vermittelt, bleibt noch aufzuklären. Möglich sind beispielsweise direkte oder indirekte *down-stream*-Moleküle von IL-16-S-Phase-spezifische Transkriptionsfaktoren, welche die Produktion der für die S-G₂-Transition benötigten Cycline und cyclinabhängigen Kinasen (CDKs, *cyclin dependent kinase*) initiieren. Ein Zusammenhang zu der zellzyklushemmenden Funktion von NT-IL-16 ist eher unwahrscheinlich, da es sich um einen reversen Effekt handelt. Das Molekül transloziert in den Kern und interagiert über seine zahlreichen Proteinbindedomänen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und co-Aktivatoren und unterbindet dadurch deren Aktivität. Infolgedessen verharren die Zellen in der G₀-Phase. Ein Verlust von NT-IL-16 fördert den Wiedereintritt in den Zellzyklus.^{197–199,338} In den vorliegenden Proliferationsstudien scheint der biologische Effekt des NT-IL-16 komplett übergangen worden zu sein, was darauf hindeutet, dass im Multiplen Myelom das sekretierte IL-16 dominant wirkt und dieses hauptsächlich relevant für die Tumorgenese ist. Allerdings wurde bei CTCL, einer hämatologischen Neoplasie von T-Lymphozyten, die Beteiligung beider Formen von IL-16 an der Tumorgenese vermutet. Sowohl die erhöhte extrazelluläre Konzentration des C-terminalen IL-16 als auch der Verlust von nukleärem NT-IL-16 war an eine Tumorprogression gebunden.²⁰⁴

Die durchgeführten Viabilitätsanalysen untermauern die progressive Wirkung von IL-16 auf den Phänotyp des Multiplen Myeloms. Infolge einer unterbundenen IL-16-Expression reagierten die Zellen mit einer deutlichen Reduktion der metabolischen Aktivität (**Abbildung 21**). Dadurch konnte gezeigt werden, dass IL-16 die allgemeine Zellfitness positiv beeinflusst und die Anfälligkeit der Myelomzellen gegenüber zellschädigenden Einflüssen dezimiert. Daher kann dieser Effekt speziell bei der Vermittlung der Chemoresistenz von großer Bedeutung sein. Es wurde bereits im Multiplen Myelom, anderen Tumorentitäten und inflammatorischen Erkrankungen beobachtet, dass Patienten mit höheren IL-16-Serumspiegeln schlechter therapierbar sind.^{243,259,339}

Weiterhin wurde der Einfluss von IL-16 auf die Apoptoserate geprüft. Der anhand der Microarray-Analyse postulierte, pro-apoptotische Effekt von IL-16 konnte funktionell nicht validiert werden. Das Zellsterben wurde in IL-16-negativen Zellen weder stimuliert noch inhibiert (**Abbildung 20**). Es zeichneten sich keine klaren Tendenzen ab. Die beobachteten Schwankungen galten daher als unauffällig.

Mithilfe von q-RT-PCR-basierten Signalwegsanalysen konnte ein weiteres Mal gezeigt werden, dass IL-16 proliferativ und überlebensfördernd wirkt. Der artifiziell induzierte Verlust von IL-16

fürte zur Hemmung aller drei getesteten Proliferationssignalwege (PI3-Kinase-, NFκB- und MAP-Kinase-Signalweg (**Abbildung 17A, B, C**)). Diese Signalkaskaden werden durch externe Signale stimuliert^{340–342} und sind bedeutend für die Herausbildung sämtlicher solider und hämatologischer Tumore.^{294–297,343} Da IL-16 mehrere Proliferationskaskaden anregt, ist von einem übergeordneten Effekt des Cytokins auszugehen. Damit wird IL-16 vergleichbar mit den prominentesten Wachstumsfaktoren des Multiplen Myeloms IL-6, IGF-1 und VEGF, die ihre tumorunterstützenden Funktionen, wie die Förderung des Wachstums, Überlebens, der Angiogenese und der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, u. a. über die Aktivierung dieser drei Signalwege ausüben. (detaillierte Information siehe **Kapitel 1.1.3** oder Übersichtsartikel van de Donk et al.³⁴⁴).

Dass IL-16 die drei wichtigsten Signalwege der Tumorprogression aktiviert, untermauert die Relevanz des Cytokins als autokrinen, proliferativen Faktor der Myelomzellen. Neben zahlreichen akzessorischen Proteinen ist auch die Expression vieler Schlüsselproteine der Signalwege durch den Verlust der IL-16-Expression betroffen. Dazu zählen beispielsweise mTor, Ras, NFκB1 und 2, Jun, Fos und zahlreiche MAP-Kinasen (**Abbildung 17**). Für den spezifischen Kontext des Multiplen Myeloms sind folgende Herunterregulationen infolge eines IL-16-Knockdowns besonders interessant: IL-1β und IL-1R,^{345,346} CD40³⁴⁷, IGF1³⁴⁸ und PKC-β,³⁴⁹ da für diese Moleküle bereits ein progressiver Effekt auf das Multiple Myelom beschrieben wurde. Weiterhin übernehmen zehn der herunterregulierten Gene einen positiven Effekt auf die IL-6-Produktion.³⁰⁰ Im Umkehrschluss stimuliert IL-16 also die IL-6-Synthese in den Myelomzellen. Der größte Anteil des extrazellulären Wachstumsfaktors im Knochenmark ist auf die IL-6-Produktion der BMSC zurückzuführen. Jedoch konnte bereits eine autokrine IL-6-Produktion der Myelomzellen beschrieben werden.³⁵⁰

Dass IL-6, CD40 und IGF-1 eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese des Multiplen Myeloms einnehmen und an der Etablierung des tumorfreundlichen Milieus im Knochenmark maßgeblich beteiligt sind, wurde ausführlich in **Kapitel 1.1.2** beschrieben. Daher ist es besonders interessant, dass die Expression dieser Moleküle bzw. die der Rezeptoren durch IL-16 aktiviert wurde. IL-6, CD40 und IGF-1 werden bereits in klinischen Studien als Zielstrukturen zur Therapie des Multiplen Myeloms untersucht.^{351–353} Auf der Grundlage der vorliegenden Daten wäre dies in der Zukunft auch für IL-16 denkbar.

- Fazit

IL-16 verübt seinen progressiven Effekt über die autokrine Stimulierung zentraler Proliferationssignalwege. Insbesondere fördert IL-16 die Zellzyklusprogression am Phasenkontrollpunkt der S-Phase-G₂-Phase-Transition. Weiterhin erhöht das Cytokin die Myelomzellviabilität und aktiviert die Expression zentraler Wachstumsfaktoren und Oberflächenmoleküle, welche die Tumorgenese weiter vorantreiben.

4.2.2.2 Interleukin-16 besitzt die Fähigkeit zur parakrinen Wachstumsförderung

In der vorliegenden Arbeit wurden das Expressions- und Sekretionsverhalten der malignen Plasmazellen sowie signifikante autokrine Effekte von IL-16 auf die Tumorprogression der Myelomzellen und dessen Wirkmechanismen aufgeklärt.

Die originär beschriebene biologische Bedeutung von IL-16 als Immunmodulator und chemotaktischer Faktor für eine Vielzahl von Leukozyten unterstreicht hingegen die tendenziell parakrine Funktionalität von IL-16.^{165,173,175,202} Im Kontext des Multiplen Myeloms ist neben der autokrinen Tumorprogression daher ein zusätzlicher parakriner Effekt wahrscheinlich.

Erhöhte IL-16-Level in tumorfernen Bereichen, wie beispielsweise im peripheren Blut bei Myelompatienten^{6,246,255} oder in Pleuralergüssen bei Lungenkrebspatienten²⁴¹ unterstreichen die Vermutung übergreifenden Effekts von IL-16. Die IL-16-Plasmakonzentrationen im Knochenmark von Myelompatienten sind in etwa 20 - 40-fach höher, als die IL-16-Konzentrationen im peripheren Blutplasma der gleichen Patienten.²⁶⁰ Das ist ein Indiz für einen typischen Gradienten eines chemotaktischen Lockstoffs. Da es sich bei IL-16 ursprünglich beschrieben um ein chemotaktisches Cytokin handelt, ist eine solche Funktion auch bei der Progression des Multiplen Myelom denkbar. In soliden Brusttumoren konnte der chemotaktische Effekt von überexprimiertem IL-16 auf die Rekrutierung tumorassoziierter Makrophagen (TAMs) bereits gezeigt werden.²³⁸ TAMs sind allgemein bekannt für ihre tumorfördernde Wirkung. Kürzlich konnte diese Wirkung spezifisch für die Progression des Multiplen Myeloms bestätigt werden.³⁵⁴

Eine Vielzahl weiterer hämatologischer Zellen reagiert auf einen Gradienten des chemotaktischen Faktors. IL-16-Zielzellen, für die insbesondere ein progressiver Effekt auf die Pathogenese des Multiplen Myeloms beschrieben wurde, sind dendritische Zellen und

Eosinophile. Dendritische Zellen werden verstärkt in die Tumorumgebung des Multiplen Myeloms rekrutiert, interagieren dort mit dem Stroma und verstärken autokrin und parakrin die mitogenen Cytokinströme.^{355,356} Auch Eosinophile reagieren mit migrativem Verhalten auf IL-16. Im Multiplen Myelom weisen sie eine hohe Kontaktdichte zu den malignen Plasmazellen auf und produzieren Plasmazellüberlebensfaktoren (IL-6, APRIL, TNF- α) zur Stimulation der Myelomzellproliferation.^{357,358}

Ebenfalls werden präferenziell regulatorische T-Zellen und T_{H17}-Zellen durch IL-16 angelockt, die in der Mikroumgebung des Tumors ein immunsuppressives Milieu erzeugen und die Eliminierung entarteter Zellen unterbinden.³⁵⁹ Die migrative Reaktion der regulatorischen T-Zellen ist weiterhin an eine verstärkte Expression von FoxP3 geknüpft, wodurch der immunsuppressive Phänotyp dieser Zellen zusätzlich stabilisiert wird.²⁰⁸ T_{H17}-Zellen modulieren eine myelomzellfreundliche Mikroumgebung, indem sie durch Cytokinsekretion (IL-1 β , IL-6, IL-17, MCP-1, MIP-1 α , MMP-9) die Osteoclasteaktivierung induzieren, die Angiogenese einleiten und die parakrine IL-6-Sekretion durch die BMSCs erhöhen. Ferner fördern T_{H17}-Zellen die Transdifferenzierung von unreifen dendritischen Zellen zu Osteoclasten und verüben darüber einen indirekten Effekt auf das Tumorwachstum.^{355,360–362}

Aufgrund der pleiotropen Eigenschaften von IL-16 (**siehe Kapitel 1.2.3**) ist es innerhalb der Mikroumgebung des Multiplen Myeloms möglich, dass IL-16 neben der Leukozytenaktivierung ebenfalls die immunologische Reaktion rekrutierter, anti-tumoraler Lymphozyten hemmt, denn immunsuppressive Effekte von IL-16 wurden schon mehrfach beschrieben.^{209–211,363}

Weiterhin ist bekannt, dass IL-16 seine Zielzellen zur Cytokinproduktion anregen kann und es häufig in Verbindung mit anderen Cytokinen eine Effektsteigerung seiner biologischen Funktionen sowie die der anderen Cytokine erzielt.^{175,188,205,363} Daher ist es denkbar, dass die deregulierte Sekretion von IL-16 durch die neoplastische Plasmazelle den regen Cytokinstrom in der tumorassoziierten Mikroumgebung stimuliert, der charakteristisch und essentiell für die Pathogenese des Multiplen Myeloms ist (**siehe Kapitel 1.1.2**).

Ob die starke Rekrutierung der tumorassoziierten Leukozyten des Multiplen Myeloms tatsächlich in den hohen Konzentrationen des chemotaktischen Faktors IL-16 begründet liegen, und welche Bedeutung IL-16 bei der Etablierung und dem Erhalt des Cytokinnetzwerks in der Tumorumgebung zukommt, muss noch experimentell validiert werden. Die beschriebenen Zusammenhänge liefern jedoch erste Hinweise und verdeutlichen das hohe

Potential von IL-16 als zukünftige Zielstruktur innovativer Therapien zur Bekämpfung des Multiplen Myeloms.

- Fazit

Die Ergebnisse vieler verschiedener Studien lassen Rückschlüsse auf eine mögliche Beteiligung von IL-16 bei der Modulierung einer tumorunterstützenden Mikroumgebung zu. Dabei könnte IL-16 sowohl die zelluläre als auch die nicht-zelluläre Komposition des Tumormilieus mitgestalten.

4.2.3 Interleukin-16 beeinflusst maßgeblich den Selbsterneuerungsprozess der Myelomvorläuferzellen

Wie in vielen anderen Tumorerkrankungen existiert im Multiplen Myelom ein geringer Anteil an Tumorzellen, die zur Selbsterneuerung und daher zum klonalen Wachstum befähigt sind. Außerdem weisen diese Zellen eine verstärkte Arzneimittelresistenz auf und befinden sich in einem weniger differenzierten Zustand als die Mehrzahl der Zellen, die den Tumor gestalten. Diese drei Charakteristika verleihen diesen Zellen eine starke Ähnlichkeit zu den adulten Stammzellen und werden daher häufig als Tumorstammzelle oder Vorläuferzelle des Multiplen Myeloms bezeichnet. Neben der Tumorinitiierung werden sie für die hohen Rezidivraten bei Myelompatienten verantwortlich gemacht.^{130,135,309}

Im Rahmen der Charakterisierung von IL-16 im Multiplen Myelom wurde gezeigt, dass IL-16 das klonale Wachstum der Myelomzellen vollständig unterbindet (**Abbildung 18**). Demnach stimuliert IL-16 nicht nur die Proliferation der Gesamttumorpopulation, sondern speziell auch den Selbsterneuerungsprozess der Vorläuferzellen des Multiplen Myeloms. Auch CD40 und IGF-1 sind bekannt dafür, den Selbsterneuerungsprozess der Myelomvorläuferzellen auszulösen.^{364–366} Da IL-16 die Expression der Oberflächenmoleküle CD40 und IGFR1 aktiviert (**Abbildung 17**), vermittelt das Cytokin möglicherweise auf diese Weise die Fähigkeit zum klonalen Wachstum. Co-Kulturexperimente belegen, dass die Anwesenheit von dendritischen Zellen ebenfalls eine verstärkte Selbsterneuerung auslöst.³⁶⁷ Da von B-Zellen sekretiertes IL-16 eine stark chemotaktische Wirkung auf dendritische Zellen hat,¹⁶⁸ ist auch hier ein zusätzlicher parakriner Effekt von IL-16 denkbar.

Vorläufige Studien weisen zwar auf eine Förderung der B-Zelldifferenzierung durch IL-16 hin, allerdings erfolgten diese Untersuchungen im nicht-malignen, murinen Zusammenhang und

betrafen die frühen Stadien der B-Zellreifung (pro- zu prä-B-Zelle).¹⁷⁷ Aus den Microarray-Analysen der Myelomzellen wurde hingegen die Hemmung der Zelldifferenzierung durch IL-16 abgeleitet (Tabelle 9). Da sich die Vorläuferzellen in einem weniger differenzierten Zustand befinden, als deren Tochterzellen stellt IL-16 möglicherweise durch ein Unterbinden der weiteren Differenzierung den Erhalt des Stammzellphänotyps sicher. Weiterhin wirkte sich die Expression von IL-16 positiv auf die Zellviabilität der Myelomzellen aus (Abbildung 21), woraus sich eine schützende Wirkung des Cytokins vor externen Stresssignalen ableiten lässt. Jenes liefert einen weiteren Hinweis dafür, dass IL-16 die Funktionalität der Myelomstammzelle fördert und damit die dritte wichtige Eigenschaft des Stammzellphänotyps, nämlich die Arzneimittelresistenz, hervorruft.

Da Myelomvorläuferzellen sehr wahrscheinlich die schlechte Therapierbarkeit und die hohen Rückfallquoten der Myelompatienten bedingen, sollten sich innovative Therapieansätze gegen diese Zellen richten. Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen, dass IL-16 für diesen Ansatz ein potentiellles Zielmolekül darstellt.

- **Fazit**

Der Verlust von Interleukin-16 hemmt drastisch die Fähigkeit der Myelomstammzelle zur Selbsterneuerung. Damit unterstützt IL-16 einen Prozess, der die Tumorinitiierung sowie die Progression und den Erhalt der Neoplasie gewährleistet.

4.3 Ausblick

Eingangs wurde auf die dringende Notwendigkeit hingewiesen, die Tumorbiologie des Multiplen Myeloms detaillierter und differenzierter zu charakterisieren, um mögliche therapeutische Zielstrukturen ableiten zu können, die den gewünschten Erfolg bei der Bekämpfung dieser hämatologischen Tumorerkrankung bringen, die bisher noch immer mit einer hohen Rückfallquote und geringen Überlebensraten von 5 – 7 Jahren assoziiert ist. Die beobachteten Auffälligkeiten einer stark erhöhten IL-16-Serumkonzentration bei Patienten des Multiplen Myeloms, die darüber hinaus an eine schlechte Überlebensprognose gekoppelt zu sein schien, bildeten die Grundlage der vorliegenden Untersuchungen.

Die erstmalige Charakterisierung von IL-16 in der hämatologischen Tumorerkrankung des Multiplen Myeloms brachte viele spannende Aspekte hervor, die dessen Mitwirkung an der Progression der Pathogenese bestätigen. Entscheidend für das große Potential von IL-16 als

zukünftiges therapeutisches Target ist zum einen sein wachstumsstimulierender Effekt auf die differenzierten Myelomzellen. Klinisch noch bedeutender ist jedoch, dass IL-16 den Erhalt des Stammzellphänotyps der Myelomvorläuferzelle maßgeblich unterstützt und den Selbsterneuerungsprozess der Vorläuferzellen essentiell mitgestaltet.

Da es sich um ein sehr junges Forschungsfeld handelt, gehen aus dieser Arbeit zahlreiche neue Fragestellungen hervor. Beispielsweise sind die genauen Wirkmechanismen, über die IL-16 seine Effekte verübt, noch nicht hinreichend beschrieben. Weiterhin sollte der Einfluss von IL-16 auf weitere funktionelle Systeme, wie dem Adhäsions- und Migrationsverhalten der Myelomzellen oder der Vermittlung der Arzneimittelresistenz eruiert werden.

Die progressive Unterstützung des Tumorwachstums durch IL-16 wurde bisher aus Forschungsarbeiten an Monokulturen abgeleitet. Aufgrund seiner chemotaktischen und immunmodulatorischen Eigenschaften ist ein übergeordneter Effekt von IL-16 auf die Rekrutierung tumorassoziierter, akzessorischer Zellen sowie auf die Komposition des tumorfördernden Cytokinnetzwerks denkbar und sollte in zukünftigen Analysen eruiert werden. Neben den tumorintrinsic Mechanismen bietet die Mikroumgebung des Tumors zahlreiche Angriffspunkte, um das progressive und invasive Tumorwachstum erfolgreich zu unterbinden. In der klinisch-onkologischen Forschung gewinnen stromagerichtete Therapieansätze daher zunehmend an Bedeutung.^{368,369} Kann in weiterführenden Analysen die in Kapitel 4.2.2.2 diskutierte Vermutung über einen bedeutenden parakrinen Effekt von IL-16 zur Herausbildung des tumorfördernden Milieus bestätigt werden, würde jenes die Eignung des Cytokin als vielversprechende therapeutische Zielstruktur zusätzlich untermauern. Aufgrund der hohen Komplexität der autokrinen und parakrinen Cytokinausstöße und positiven Feedbackschleifen in der Mikroumgebung des Multiplen Myeloms sind multitherapeutische Ansätze obligatorisch.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
ASCT	<i>autologous stem cell transplantation</i>
BMEC	<i>bone marrow endothelial cell</i>
BMSC	<i>bone marrow stromal cell</i>
Bp	<i>base pair</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
cDNA	<i>coding deoxyribonucleic acid</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
CCPM	<i>corrected counts per minute</i>
CLOCK	circadian locomotor output cycles kaput
CPM	<i>counts per minute</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CREBBP	<i>CREB binding protein</i>
CT	<i>carboxyterminal</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>
CTCL	<i>cutaneous T cell lymphoma</i>
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate buffered saline</i>
ECM	<i>extra cellular matrix</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme-linked immuno spot</i>
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FOXP	<i>forkhead box protein</i>
FSC	forward scatter
g	Gramm
x x g	x-fache Erdbeschleunigung
GABP	<i>GA binding protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HIV	Human immunodeficiency virus
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule 1</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>
inkl.	inklusive
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	kilo
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LCF	<i>lymphocyte chemoattractant factor</i>
LTR	<i>long terminal repeats</i>
μ	micro
m	Meter
m	milli
MAP	mitogen activated protein
MFI	<i>mean fluorescent intensity</i>
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
min	Minute
M	Molar
Mio	Million
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	nano
NADH	Nikotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinucleotidphosphat
NF κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
NT	<i>aminoterminal</i>
OD	<i>optical density</i>
OPG	Osteoprotegerin
p	pico
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
per se	<i>in itself</i>
PEST	Prolin (P) Glutamat (E) Serin (S) Threonin (T)
pH	potentia hydrogenii
PHA	Phytohaemagglutamin
PI3K	Phosphatidylinosid-3 Kinase
PMA	Phorbol myristate acetate
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i>
q-RT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RAG	<i>recombinase activating genes</i>
RANK	<i>receptor activator of nuclear factor-κB</i>

RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i>
RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunde
SFU	<i>spot forming unit</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
shRNAmir	<i>microRNA-adapted short hairpin RNA</i>
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>
SSC	<i>side scatter</i>
SV40	Simian Virus 40
TAMs	<i>tumor associated macrophages</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF	<i>tumor growth factor</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
T _m	Schmelztemperatur
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
o. g.	oben genannt
o. V.	ohne Verfasser
U	units
u. a.	unter anderem
V	Volt
VCAM	<i>vascular cell adhesion protein</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
VSV-G	Vesicular Stromatitis Virus
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
ZAP	<i>Zeta-chain-associated protein kinase</i>
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren:

A (Ala)	Alanin	M (Met)	Methionin
C (Cys)	Cystein	N (Asp)	Asparagin
D (Asp)	Asparaginsäure	P (Pro)	Prolin
E (Glu)	Glutaminsäure	Q (Glu)	Glutamin
F (Phe)	Phenylalanin	R (Arg)	Arginin
G (Gly)	Glycin	S (Ser)	Serin
H (His)	Histidin	T (Thr)	Threonin
I (Ile)	Isoleucin	V (Val)	Valin
K (Lys)	Lysin	W (Trp)	Tryptophan
L (Leu)	Leucin	Y (Tyr)	Tyrosin

LITERATURVERZEICHNIS

1. SEER Cancer Statistics Review 1975-2010. at <http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/>
2. Pingali, S. R., Haddad, R. Y. & Saad, A. Current concepts of clinical management of multiple myeloma. *Dis. Mon.* **58**, 195–207 (2012).
3. Kyle, R. A. & Rajkumar, S. V. Multiple myeloma. *Blood* **111**, 2962–72 (2008).
4. Palumbo, A. & Anderson, K. Multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1046–60 (2011).
5. Wirk, B. Renal failure in multiple myeloma: a medical emergency. *Bone Marrow Transplant.* **46**, 771–83 (2011).
6. Koike, M. *et al.* Relationship between CD4(+)/CD8(+) T cell ratio and T cell activation in multiple myeloma: reference to IL-16. *Leuk. Res.* **26**, 705–11 (2002).
7. DGHO. Monoklonale Gammopathie Unklarer Signifikanz MGUS. at <<http://www.dgho-onkopedia.de/de/mein-onkopedia/leitlinien/monoklonale-gammopathie-unklarer-signifikanz-mgus/monoklonale-gammopathie-unklarer-signifikanz-mgus.pdf>>
8. Hjorth, M. *et al.* Initial versus deferred melphalan-prednisone therapy for asymptomatic multiple myeloma stage I--a randomized study. Myeloma Group of Western Sweden. *Eur. J. Haematol.* **50**, 95–102 (1993).
9. Harousseau, J.-L. Ten years of improvement in the management of multiple myeloma: 2000-2010. *Clin. Lymphoma. Myeloma Leuk.* **10**, 424–42 (2010).
10. Kumar, S. K. *et al.* Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines. *Mayo Clin. Proc.* **84**, 1095–110 (2009).
11. Ludwig, H. *et al.* Multiple myeloma treatment strategies with novel agents in 2011: a European perspective. *Oncologist* **16**, 388–403 (2011).
12. Cavo, M. *et al.* International Myeloma Working Group consensus approach to the treatment of multiple myeloma patients who are candidates for autologous stem cell transplantation. *Blood* **117**, 6063–73 (2011).
13. Saad, A. A., Sharma, M. & Higa, G. M. Treatment of multiple myeloma in the targeted therapy era. *Ann. Pharmacother.* **43**, 329–38 (2009).
14. Munshi, N. C. Plasma cell disorders: an historical perspective. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 297 (2008). doi:10.1182/asheducation-2008.1.297
15. Chng, W. J. *et al.* Ploidy status rarely changes in myeloma patients at disease progression. *Leuk. Res.* **30**, 266–71 (2006).
16. Avet-Loiseau, H. *et al.* Chromosomal abnormalities are major prognostic factors in elderly patients with multiple myeloma: the intergroupe francophone du myélome experience. *J. Clin. Oncol.* **31**, 2806–9 (2013).
17. Gabrea, A., Bergsagel, P. L., Chesi, M., Shou, Y. & Kuehl, W. M. Insertion of excised IgH switch sequences causes overexpression of cyclin D1 in a myeloma tumor cell. *Mol. Cell* **3**, 119–23 (1999).
18. Chesi, M. *et al.* Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood* **88**, 674–81 (1996).
19. Shaughnessy, J. *et al.* Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood* **98**, 217–23 (2001).

20. Chesi, M. *et al.* Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* **91**, 4457–63 (1998).
21. Hurt, E. M. *et al.* Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* **5**, 191–9 (2004).
22. Bergsagel, P. L. & Kuehl, W. M. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* **23**, 6333–8 (2005).
23. Shou, Y. *et al.* Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 228–33 (2000).
24. Kuehl, W. M. & Bergsagel, P. L. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 175–87 (2002).
25. Corradini, P. *et al.* Mutational activation of N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. *Blood* **81**, 2708–13 (1993).
26. Bezieau, S. *et al.* High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Hum. Mutat.* **18**, 212–24 (2001).
27. Zhan, F. *et al.* The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* **108**, 2020–8 (2006).
28. Mitsiades, C. S. *et al.* The role of the bone marrow microenvironment in the pathophysiology of myeloma and its significance in the development of more effective therapies. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **21**, 1007–34, vii–viii (2007).
29. Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A. & Dalton, W. S. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* **93**, 1658–67 (1999).
30. Akiyama, M. *et al.* Cytokines modulate telomerase activity in a human multiple myeloma cell line. *Cancer Res.* **62**, 3876–82 (2002).
31. Chauhan, D. *et al.* Blockade of ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 enhances anti-myeloma activity of Bortezomib/Proteasome inhibitor PS-341. *Oncogene* **23**, 3597–602 (2004).
32. Hideshima, T. *et al.* Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood* **107**, 4053–62 (2006).
33. Podar, K. *et al.* Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood* **98**, 428–35 (2001).
34. Freund, G. G., Kulas, D. T. & Mooney, R. A. Insulin and IGF-1 increase mitogenesis and glucose metabolism in the multiple myeloma cell line, RPMI 8226. *J. Immunol.* **151**, 1811–20 (1993).
35. Vanderkerken, K., Asosingh, K., Braet, F., Van Riet, I. & Van Camp, B. Insulin-like growth factor-1 acts as a chemoattractant factor for 5T2 multiple myeloma cells. *Blood* **93**, 235–41 (1999).
36. Podar, K. *et al.* Vascular endothelial growth factor-induced migration of multiple myeloma cells is associated with beta 1 integrin- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent PKC alpha activation. *J. Biol. Chem.* **277**, 7875–81 (2002).
37. Hideshima, T. *et al.* The biological sequelae of stromal cell-derived factor-1alpha in multiple myeloma. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 539–44 (2002).
38. Mitsiades, C. S. *et al.* Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell* **5**, 221–30 (2004).

39. L'Hôte, C. G. M. & Knowles, M. A. Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis. *Exp. Cell Res.* **304**, 417–31 (2005).
40. Otsuki, T. *et al.* Expression of fibroblast growth factor and FGF-receptor family genes in human myeloma cells, including lines possessing t(4;14)(q16.3;q32. 3) and FGFR3 translocation. *Int. J. Oncol.* **15**, 1205–12 (1999).
41. Chauhan, D. *et al.* Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* **87**, 1104–12 (1996).
42. Chauhan, D. *et al.* A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer Cell* **8**, 407–19 (2005).
43. Moreaux, J. *et al.* BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood* **103**, 3148–57 (2004).
44. Hideshima, T. & Anderson, K. C. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 927–37 (2002).
45. Hideshima, T., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M. & Anderson, K. C. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* **104**, 607–18 (2004).
46. Roodman, G. D. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Blood Cells. Mol. Dis.* **32**, 290–2
47. Roodman, G. D. New potential targets for treating myeloma bone disease. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6270s–6273s (2006).
48. Jakob, C. *et al.* Angiogenesis in multiple myeloma. *Eur. J. Cancer* **42**, 1581–90 (2006).
49. Ribatti, D., Nico, B. & Vacca, A. Importance of the bone marrow microenvironment in inducing the angiogenic response in multiple myeloma. *Oncogene* **25**, 4257–66 (2006).
50. Hideshima, T., Chauhan, D., Schlossman, R., Richardson, P. & Anderson, K. C. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene* **20**, 4519–27 (2001).
51. Urashima, M. *et al.* Transforming growth factor-beta1: differential effects on multiple myeloma versus normal B cells. *Blood* **87**, 1928–38 (1996).
52. Dankbar, B. *et al.* Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* **95**, 2630–6 (2000).
53. Gupta, D. *et al.* Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia* **15**, 1950–61 (2001).
54. Urashima, M., Chauhan, D., Uchiyama, H., Freeman, G. J. & Anderson, K. C. CD40 ligand triggered interleukin-6 secretion in multiple myeloma. *Blood* **85**, 1903–12 (1995).
55. Tai, Y.-T. *et al.* Mechanisms by which SGN-40, a humanized anti-CD40 antibody, induces cytotoxicity in human multiple myeloma cells: clinical implications. *Cancer Res.* **64**, 2846–52 (2004).
56. Tai, Y.-T. *et al.* Human anti-CD40 antagonist antibody triggers significant antitumor activity against human multiple myeloma. *Cancer Res.* **65**, 5898–906 (2005).
57. Vacca, A. *et al.* Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood* **93**, 3064–73 (1999).
58. Roccaro, A. M. *et al.* Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Res.* **66**, 184–91 (2006).

59. Kline, M. *et al.* Cytokine and chemokine profiles in multiple myeloma; significance of stromal interaction and correlation of IL-8 production with disease progression. *Leuk. Res.* **31**, 591–8 (2007).
60. Michigami, T. *et al.* Cell-cell contact between marrow stromal cells and myeloma cells via VCAM-1 and alpha(4)beta(1)-integrin enhances production of osteoclast-stimulating activity. *Blood* **96**, 1953–60 (2000).
61. Pearce, R. N. *et al.* Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 11581–6 (2001).
62. Tian, E. *et al.* The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2483–94 (2003).
63. Roodman, G. D. *et al.* Interleukin 6. A potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone. *J. Clin. Invest.* **89**, 46–52 (1992).
64. Ogata, A. *et al.* IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J. Immunol.* **159**, 2212–21 (1997).
65. Brocke-Heidrich, K. *et al.* Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood* **103**, 242–51 (2004).
66. Oshiro, M. M. *et al.* Inhibition of JAK kinase activity enhances Fas-mediated apoptosis but reduces cytotoxic activity of topoisomerase II inhibitors in U266 myeloma cells. *Clin. Cancer Res.* **7**, 4262–71 (2001).
67. Catlett-Falcone, R. *et al.* Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* **10**, 105–15 (1999).
68. Tu, Y., Gardner, A. & Lichtenstein, A. The Phosphatidylinositol 3-Kinase / AKT Kinase Pathway in Multiple Myeloma Plasma Cells : Roles in Cytokine-dependent Survival and Proliferative Responses The Phosphatidylinositol 3-Kinase / AKT Kinase Pathway in Multiple Myeloma Plasma Cells : Roles in C. 6763–6770 (2000).
69. Hideshima, T., Nakamura, N., Chauhan, D. & Anderson, K. C. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* **20**, 5991–6000 (2001).
70. Rowley, M. & Van Ness, B. Activation of N-ras and K-ras induced by interleukin-6 in a myeloma cell line: implications for disease progression and therapeutic response. *Oncogene* **21**, 8769–75 (2002).
71. Hu, L. *et al.* Downstream effectors of oncogenic ras in multiple myeloma cells. *Blood* **101**, 3126–35 (2003).
72. Abroun, S. *et al.* Receptor synergy of interleukin-6 (IL-6) and insulin-like growth factor-I in myeloma cells that highly express IL-6 receptor alpha [corrected]. *Blood* **103**, 2291–8 (2004).
73. Qiang, Y.-W., Kopantzev, E. & Rudikoff, S. Insulinlike growth factor-I signaling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates, and pathway cross-talk. *Blood* **99**, 4138–46 (2002).
74. Mitsiades, C. S. *et al.* Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene* **21**, 5673–83 (2002).
75. Masih-Khan, E. *et al.* MIP-1alpha (CCL3) is a downstream target of FGFR3 and RAS-MAPK signaling in multiple myeloma. *Blood* **108**, 3465–71 (2006).

76. Lentzsch, S. *et al.* PI3-K/AKT/FKHR and MAPK signaling cascades are redundantly stimulated by a variety of cytokines and contribute independently to proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* **18**, 1883–90 (2004).
77. Le Gouill, S. *et al.* VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood* **104**, 2886–92 (2004).
78. Hyun, T. *et al.* Loss of PTEN expression leading to high Akt activation in human multiple myelomas. *Blood* **96**, 3560–8 (2000).
79. Shi, Y., Hsu, J., Hu, L., Gera, J. & Lichtenstein, A. Signal pathways involved in activation of p70S6K and phosphorylation of 4E-BP1 following exposure of multiple myeloma tumor cells to interleukin-6. *J. Biol. Chem.* **277**, 15712–20 (2002).
80. Puthier, D., Bataille, R. & Amiot, M. IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3945–50 (1999).
81. Schwarze, M. M. & Hawley, R. G. Prevention of myeloma cell apoptosis by ectopic bcl-2 expression or interleukin 6-mediated up-regulation of bcl-xL. *Cancer Res.* **55**, 2262–5 (1995).
82. Puthier, D. *et al.* Mcl-1 and Bcl-xL are co-regulated by IL-6 in human myeloma cells. *Br. J. Haematol.* **107**, 392–5 (1999).
83. Jourdan, M. *et al.* A major role for Mcl-1 antiapoptotic protein in the IL-6-induced survival of human myeloma cells. *Oncogene* **22**, 2950–9 (2003).
84. Lee, H. H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J. & Cheng, G. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 9136–41 (1999).
85. Stehlik, C. *et al.* Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **188**, 211–6 (1998).
86. Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V & Baldwin, A. S. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**, 1680–3 (1998).
87. Panwalkar, A., Verstovsek, S. & Giles, F. Nuclear factor-kappaB modulation as a therapeutic approach in hematologic malignancies. *Cancer* **100**, 1578–89 (2004).
88. Benayoun, B. *et al.* NF-kappaB-dependent expression of the antiapoptotic factor c-FLIP is regulated by calpain 3, the protein involved in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *FASEB J.* **22**, 1521–9 (2008).
89. Nakagawa, Y. *et al.* IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes. *Am. J. Hematol.* **81**, 824–31 (2006).
90. Lee, H. *et al.* Role of Rel-related factors in control of c-myc gene transcription in receptor-mediated apoptosis of the murine B cell WEHI 231 line. *J. Exp. Med.* **181**, 1169–77 (1995).
91. Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G. & Baldwin, A. S. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5785–99 (1999).
92. Hinz, M. *et al.* NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2690–8 (1999).
93. Joyce, D. *et al.* Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 25245–9 (1999).

94. Joyce, D. *et al.* NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev.* **12**, 73–90 (2001).
95. Ogasawara, T. *et al.* Osteoclast differentiation by RANKL requires NF-kappaB-mediated downregulation of cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6). *J. Bone Miner. Res.* **19**, 1128–36 (2004).
96. Bergsagel, P. L. *et al.* Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* **106**, 296–303 (2005).
97. Stifter, S. The role of nuclear factor kappaB on angiogenesis regulation through monocyte chemotactic protein-1 in myeloma. *Med. Hypotheses* **66**, 384–6 (2006).
98. Tatsumi, T. *et al.* Expression of adhesion molecules on myeloma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **87**, 837–42 (1996).
99. Bond, M., Fabunmi, R. P., Baker, A. H. & Newby, A. C. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett.* **435**, 29–34 (1998).
100. Vincenti, M. P., Coon, C. I. & Brinckerhoff, C. E. Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1beta-stimulated synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* **41**, 1987–94 (1998).
101. Hecht, M., von Metzler, I., Sack, K., Kaiser, M. & Sezer, O. Interactions of myeloma cells with osteoclasts promote tumour expansion and bone degradation through activation of a complex signalling network and upregulation of cathepsin K, matrix metalloproteinases (MMPs) and urokinase plasminogen activator (uPA). *Exp. Cell Res.* **314**, 1082–93 (2008).
102. Aggarwal, R., Ghobrial, I. M. & Roodman, G. D. Chemokines in multiple myeloma. *Exp. Hematol.* **34**, 1289–95 (2006).
103. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105–11 (2001).
104. Jones, R. J. Leukemic stem cells: where have they gone wrong? *Blood* **97**, 3681a–3682 (2001).
105. Dick, J. E. Breast cancer stem cells revealed. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3547–9 (2003).
106. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3983–8 (2003).
107. Zucchi, I. *et al.* The properties of a mammary gland cancer stem cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10476–81 (2007).
108. Singh, S. K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396–401 (2004).
109. O’Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106–10 (2007).
110. Dalerba, P. *et al.* Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10158–63 (2007).
111. Lapidot, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645–8 (1994).
112. Bergsagel, D. E. & Valeriote, F. A. Growth Characteristics of a Mouse Plasma Cell Tumor of a Mouse Plasma Cell Tumor1. 2187–2196
113. Hamburger, a & Salmon, S. E. Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J. Clin. Invest.* **60**, 846–54 (1977).

114. Hamburger, a W. & Salmon, S. E. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**, 461–3 (1977).
115. Bakkus, M. H., Heirman, C., Van Riet, I., Van Camp, B. & Thielemans, K. Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. *Blood* **80**, 2326–35 (1992).
116. Sahota, S., Hamblin, T., Oscier, D. G. & Stevenson, F. K. Assessment of the role of clonogenic B lymphocytes in the pathogenesis of multiple myeloma. *Leukemia* **8**, 1285–9 (1994).
117. Vescio, R. A. *et al.* Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intraclonal diversity. *J. Immunol.* **155**, 2487–97 (1995).
118. Rasmussen, T., Jensen, L. & Johnsen, H. E. The clonal hierachy in multiple myeloma. *Acta Oncol.* **39**, 765–70 (2000).
119. Yaccoby, S. & Epstein, J. The proliferative potential of myeloma plasma cells manifest in the SCID-hu host. *Blood* **94**, 3576–82 (1999).
120. Pilarski, L. M. *et al.* Myeloma progenitors in the blood of patients with aggressive or minimal disease: engraftment and self-renewal of primary human myeloma in the bone marrow of NOD SCID mice. *Blood* **95**, 1056–65 (2000).
121. Pilarski, L. M. *et al.* Leukemic B cells clonally identical to myeloma plasma cells are myelomagenic in NOD/SCID mice. *Exp. Hematol.* **30**, 221–8 (2002).
122. Matsui, W. *et al.* Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* **103**, 2332–6 (2004).
123. Asosingh, K., De Raeve, H., Van Riet, I., Van Camp, B. & Vanderkerken, K. Multiple myeloma tumor progression in the 5T2MM murine model is a multistage and dynamic process of differentiation, proliferation, invasion, and apoptosis. *Blood* **101**, 3136–41 (2003).
124. Luckey, C. J. *et al.* Memory T and memory B cells share a transcriptional program of self-renewal with long-term hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 3304–9 (2006).
125. Tomayko, M. M. *et al.* Systematic comparison of gene expression between murine memory and naive B cells demonstrates that memory B cells have unique signaling capabilities. *J. Immunol.* **181**, 27–38 (2008).
126. Schittek, B. & Rajewsky, K. Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature* **346**, 749–51 (1990).
127. Decker, D. J. *et al.* Defining subsets of naive and memory B cells based on the ability of their progeny to somatically mutate in vitro. *Immunity* **2**, 195–203 (1995).
128. McHeyzer-Williams, L. J., Cool, M. & McHeyzer-Williams, M. G. Antigen-specific B cell memory: expression and replenishment of a novel b220(-) memory b cell compartment. *J. Exp. Med.* **191**, 1149–66 (2000).
129. Aviszus, K., Zhang, X. & Wysocki, L. J. Silent development of memory progenitor B cells. *J. Immunol.* **179**, 5181–90 (2007).
130. Matsui, W. *et al.* Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res.* **68**, 190–7 (2008).
131. Agematsu, K., Hokibara, S., Nagumo, H. & Komiyama, A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol. Today* **21**, 204–6 (2000).
132. Pilarski, L. M. & Belch, A. R. Circulating monoclonal B cells expressing P glycoprotein may be a reservoir of multidrug-resistant disease in multiple myeloma. *Blood* **83**, 724–36 (1994).

133. Rottenburger, C. *et al.* Clonotypic CD20+ and CD19+ B cells in peripheral blood of patients with multiple myeloma post high-dose therapy and peripheral blood stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* **106**, 545–52 (1999).
134. Rasmussen, T., Jensen, L., Honoré, L. & Johnsen, H. E. Frequency and kinetics of polyclonal and clonal B cells in the peripheral blood of patients being treated for multiple myeloma. *Blood* **96**, 4357–9 (2000).
135. Pilarski, L. M., Szczepiek, A. J. & Belch, A. R. Deficient drug transporter function of bone marrow-localized and leukemic plasma cells in multiple myeloma. *Blood* **90**, 3751–9 (1997).
136. Center, D. M. & Cruikshank, W. Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. *J. Immunol.* **128**, 2563–8 (1982).
137. Cruikshank, W. & Center, D. M. Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. II. Purification of a lymphotactic factor (LCF). *J. Immunol.* **128**, 2569–74 (1982).
138. Bacon, K. *et al.* Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J. Interferon Cytokine Res.* **22**, 1067–8 (2002).
139. Kim, H. S. Assignment of human interleukin 16 (IL16) to chromosome 15q26.3 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet. Cell Genet.* **84**, 93 (1999).
140. Bannert, N., Adler, H. S., Werner, a, Baier, M. & Kurth, R. Molecular cloning and sequence analysis of interleukin 16 from nonhuman primates and from the mouse. *Immunogenetics* **47**, 390–7 (1998).
141. Baier, M., Bannert, N., Werner, a, Lang, K. & Kurth, R. Molecular cloning, sequence, expression, and processing of the interleukin 16 precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5273–7 (1997).
142. Croq, F. *et al.* A homologous form of human interleukin 16 is implicated in microglia recruitment following nervous system injury in leech *Hirudo medicinalis*. *Glia* **58**, 1649–62 (2010).
143. Keane, J. *et al.* Conservation of structure and function between human and murine IL-16. *J. Immunol.* **160**, 5945–54 (1998).
144. Min, W. Identification and characterization of chicken interleukin-16 cDNA. *Dev. Comp. Immunol.* **28**, 153–162 (2004).
145. Lee, M. E. *et al.* Molecular cloning and expression of rhesus macaque and sooty mangabey interleukin 16: biologic activity and effect on simian immunodeficiency virus infection and/or replication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**, 1323–8 (1998).
146. Baier, M., Werner, A., Bannert, N., Metzner, K. & Kurth, R. HIV suppression by interleukin-16. *Nature* **378**, 563 (1995).
147. Leutenegger, C. M., Huder, J. B., Hofmann-Lehmann, R. & Lutz, H. Molecular cloning and expression of feline interleukin-16. *DNA Seq.* **9**, 59–63 (1998).
148. Chupp, G. L. *et al.* Tissue and T cell distribution of precursor and mature IL-16. *J. Immunol.* **161**, 3114–9 (1998).
149. Bannert, N., Avots, a, Baier, M., Serfling, E. & Kurth, R. GA-binding protein factors, in concert with the coactivator CREB binding protein/p300, control the induction of the interleukin 16 promoter in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1541–6 (1999).
150. Ren, F. *et al.* Pro-IL-16 regulation in activated murine CD4+ lymphocytes. *J. Immunol.* **174**, 2738–45 (2005).
151. Wu, D. M. *et al.* Processing and release of IL-16 from CD4+ but not CD8+ T cells is activation dependent. *J. Immunol.* **162**, 1287–93 (1999).

152. Richmond, J., Tuzova, M., Cruikshank, W. & Center, D. Regulation of cellular processes by interleukin-16 in homeostasis and cancer. *J. Cell. Physiol.* (2013). doi:10.1002/jcp.24441
153. Zhang, Y. *et al.* Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase-3. *J. Biol. Chem.* **273**, 1144–9 (1998).
154. Dinarello, C. A. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **856**, 1–11 (1998).
155. Cruikshank, W. W. *et al.* Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5109–13 (1994).
156. Zhou, P., Devadas, K., Tewari, D., Jegorow, A. & Notkins, A. L. Processing, secretion, and anti-HIV-1 activity of IL-16 with or without a signal peptide in CD4+ T cells. *J. Immunol.* **163**, 906–12 (1999).
157. Cruikshank, W. & Little, F. Interleukin-16: the ins and outs of regulating T-cell activation. *Crit. Rev. Immunol.* **28**, 467–83 (2008).
158. Cruikshank, W. W. *et al.* Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5109–13 (1994).
159. Mühlhahn, P. *et al.* Structure of interleukin 16 resembles a PDZ domain with an occluded peptide binding site. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 682–6 (1998).
160. Kurschner, C. & Yuzaki, M. Neuronal interleukin-16 (NIL-16): a dual function PDZ domain protein. *J. Neurosci.* **19**, 7770–80 (1999).
161. Laberge, S., Cruikshank, W. W., Beer, D. J. & Center, D. M. Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. *J. Immunol.* **156**, 310–5 (1996).
162. Laberge, S., Cruikshank, W. W., Kornfeld, H. & Center, D. M. Histamine-induced secretion of lymphocyte chemoattractant factor from CD8+ T cells is independent of transcription and translation. Evidence for constitutive protein synthesis and storage. *J. Immunol.* **155**, 2902–10 (1995).
163. Rumsaeng, V. *et al.* Human mast cells produce the CD4+ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. *J. Immunol.* **159**, 2904–10 (1997).
164. Lim, K. G. *et al.* Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J. Immunol.* **156**, 2566–70 (1996).
165. Kaser, a *et al.* A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells. *J. Immunol.* **163**, 3232–8 (1999).
166. Elssner, A., Doseff, A. I., Duncan, M., Kotur, M. & Wewers, M. D. IL-16 is constitutively present in peripheral blood monocytes and spontaneously released during apoptosis. *J. Immunol.* **172**, 7721–5 (2004).
167. Sharma, V., Sparks, J. L. & Vail, J. D. Human B-cell lines constitutively express and secrete interleukin-16. *Immunology* **99**, 266–71 (2000).
168. Kaser, a *et al.* B lymphocyte-derived IL-16 attracts dendritic cells and Th cells. *J. Immunol.* **165**, 2474–80 (2000).
169. Bellini, A., Yoshimura, H., Vittori, E., Marini, M. & Mattoli, S. Bronchial epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**, 412–24 (1993).

170. Arima, M., Plitt, J., Stellato, C., Schweibert, L. & Schleimer, R. The expression of lymphocyte chemoattractant factor (LCF) in human bronchial epithelial cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **97**, 293–293 (1996).
171. Laberge, S. *et al.* Association of increased CD4+ T-cell infiltration with increased IL-16 gene expression in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**, 645–50 (1998).
172. Franz, J. K. *et al.* Interleukin-16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4+ T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2661–71 (1998).
173. Rand, T. H., Cruikshank, W. W., Center, D. M. & Weller, P. F. CD4-mediated stimulation of human eosinophils: lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration. *J. Exp. Med.* **173**, 1521–8 (1991).
174. Qi, J. C. *et al.* Human and mouse mast cells use the tetraspanin CD9 as an alternate interleukin-16 receptor. *Blood* **107**, 135–42 (2006).
175. Cruikshank, W. W., Berman, J. S., Theodore, a C., Bernardo, J. & Center, D. M. Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* **138**, 3817–23 (1987).
176. Berman, J. S., Cruikshank, W. W., Center, D. M., Theodore, A. C. & Beer, D. J. Chemoattractant lymphokines specific for the helper/inducer T-lymphocyte subset. *Cell. Immunol.* **95**, 105–12 (1985).
177. Szabo, P. *et al.* Maturation of B cell precursors is impaired in thymic-deprived nude and old mice. *J. Immunol.* **161**, 2248–53 (1998).
178. Liu, Y. *et al.* Identification of a CD4 domain required for interleukin-16 binding and lymphocyte activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 23387–95 (1999).
179. Center, D. M., Kornfeld, H. & Cruikshank, W. W. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol. Today* **17**, 476–81 (1996).
180. Ryan, T. C., Cruikshank, W. W., Kornfeld, H., Collins, T. L. & Center, D. M. The CD4-associated tyrosine kinase p56lck is required for lymphocyte chemoattractant factor-induced T lymphocyte migration. *J. Biol. Chem.* **270**, 17081–6 (1995).
181. Cruikshank, W. W., Greenstein, J. L., Theodore, a C. & Center, D. M. Lymphocyte chemoattractant factor induces CD4-dependent intracytoplasmic signaling in lymphocytes. *J. Immunol.* **146**, 2928–34 (1991).
182. Nicoll, J. *et al.* Identification of domains in IL-16 critical for biological activity. *J. Immunol.* **163**, 1827–32 (1999).
183. Lynch, E. A., Heijens, C. A. W., Horst, N. F., Center, D. M. & Cruikshank, W. W. Cutting edge: IL-16/CD4 preferentially induces Th1 cell migration: requirement of CCR5. *J. Immunol.* **171**, 4965–8 (2003).
184. Mashikian, M. V *et al.* Reciprocal desensitization of CCR5 and CD4 is mediated by IL-16 and macrophage-inflammatory protein-1 beta, respectively. *J. Immunol.* **163**, 3123–30 (1999).
185. Xiao, X. *et al.* Constitutive cell surface association between CD4 and CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7496–501 (1999).
186. Liu, C. *et al.* IL-16 signaling specifically induces STAT6 activation through CD4. *Cytokine* **38**, 145–50 (2007).
187. Parada, N. A., Cruikshank, W. W., Danis, H. L., Ryan, T. C. & Center, D. M. IL-16- and other CD4 ligand-induced migration is dependent upon protein kinase C. *Cell. Immunol.* **168**, 100–6 (1996).
188. Parada, N. A. *et al.* Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2. *J. Immunol.* **160**, 2115–20 (1998).

189. Krautwald, S. IL-16 activates the SAPK signaling pathway in CD4+ macrophages. *J. Immunol.* **160**, 5874–9 (1998).
190. Mathy, N. L., Bannert, N., Norley, S. G. & Kurth, R. Cutting edge: CD4 is not required for the functional activity of IL-16. *J. Immunol.* **164**, 4429–32 (2000).
191. Stoitzner, P. *et al.* Interleukin-16 supports the migration of Langerhans cells, partly in a CD4-independent way. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 641–9 (2001).
192. Fenster, C. P., Chisnell, H. K., Fry, C. R. & Fenster, S. D. The role of CD4-dependent signaling in interleukin-16 induced c-Fos expression and facilitation of neurite outgrowth in cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.* **485**, 212–6 (2010).
193. Engel, S. *et al.* Dynamics of microglial activation after human traumatic brain injury are revealed by delayed expression of macrophage-related proteins MRP8 and MRP14. *Acta Neuropathol.* **100**, 313–22 (2000).
194. Liebrich, M. *et al.* Expression of interleukin-16 by tumor-associated macrophages/activated microglia in high-grade astrocytic brain tumors. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **55**, 41–7
195. Zhang, Y. *et al.* Nuclear translocation of the N-terminal prodomain of interleukin-16. *J. Biol. Chem.* **276**, 1299–303 (2001).
196. Wilson, K. C., Cruikshank, W. W., Center, D. M. & Zhang, Y. Prointerleukin-16 contains a functional CcN motif that regulates nuclear localization. *Biochemistry* **41**, 14306–12 (2002).
197. Bannert, N. *et al.* PDZ Domain-mediated interaction of interleukin-16 precursor proteins with myosin phosphatase targeting subunits. *J. Biol. Chem.* **278**, 42190–9 (2003).
198. Zhang, Y., Tuzova, M., Xiao, Z. J. & Cruikshank, W. W. Pro-IL-16 Recruits Histone Deacetylase 3 to the. (2008).
199. Center, D. M., Cruikshank, W. W. & Zhang, Y. Nuclear pro-IL-16 regulation of T cell proliferation: p27(KIP1)-dependent G0/G1 arrest mediated by inhibition of Skp2 transcription. *J. Immunol.* **172**, 1654–60 (2004).
200. Wilson, K. C. *et al.* Regulation of nuclear Prointerleukin-16 and p27(Kip1) in primary human T lymphocytes. *Cell. Immunol.* **237**, 17–27 (2005).
201. Cruikshank, W. *et al.* Biological activity of interleukin-16. *Nature* **382**, 501–2 (1996).
202. Wilson, K. C., Center, D. M. & Cruikshank, W. W. The effect of interleukin-16 and its precursor on T lymphocyte activation and growth. *Growth Factors* **22**, 97–104 (2004).
203. Zhang, X. M. & Xu, Y. H. The associated regulators and signal pathway in rIL-16/CD4 mediated growth regulation in Jurkat cells. *Cell Res.* **12**, 363–72 (2002).
204. Richmond, J. *et al.* Interleukin-16 as a marker of Sézary syndrome onset and stage. *J. Clin. Immunol.* **31**, 39–50 (2011).
205. Mathy, N. L. *et al.* Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. *Immunology* **100**, 63–69 (2000).
206. Bandeira-Melo, C. *et al.* IL-16 promotes leukotriene C(4) and IL-4 release from human eosinophils via CD4- and autocrine CCR3-chemokine-mediated signaling. *J. Immunol.* **168**, 4756–63 (2002).
207. Ferland, C., Flamand, N., Davoine, F., Chakir, J. & Laviolette, M. IL-16 activates plasminogen-plasmin system and promotes human eosinophil migration into extracellular matrix via CCR3-chemokine-mediated signaling and by modulating CD4 eosinophil expression. *J. Immunol.* **173**, 4417–24 (2004).

208. McFadden, C. *et al.* Preferential migration of T regulatory cells induced by IL-16. *J. Immunol.* **179**, 6439–45 (2007).
209. Theodore, a C. *et al.* CD4 ligand IL-16 inhibits the mixed lymphocyte reaction. *J. Immunol.* **157**, 1958–64 (1996).
210. Cruikshank, W. W. *et al.* IL-16 inhibition of CD3-dependent lymphocyte activation and proliferation. *J. Immunol.* **157**, 5240–8 (1996).
211. Ogasawara, H. *et al.* Inhibitory effect of interleukin-16 on interleukin-2 production by CD4+ T cells. *Immunology* **96**, 215–9 (1999).
212. Li, Y. S., Wasserman, R., Hayakawa, K. & Hardy, R. R. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* **5**, 527–35 (1996).
213. Hoennscheidt, C., Max, D., Richter, N. & Staeger, M. S. Expression of CD4 on Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Scand. J. Immunol.* **70**, 216–25 (2009).
214. Kramer, M. F., Mack, B. & Rasp, G. Immunohistological expression of interleukin 16 in human tonsils. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* **127**, 1120–5 (2001).
215. Masuda, K., Katoh, N., Okuda, F. & Kishimoto, S. Increased levels of serum interleukin-16 in adult type atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* **83**, 249–53 (2003).
216. Yoshimoto, T. *et al.* Role of IL-16 in delayed-type hypersensitivity reaction. *Blood* **95**, 2869–74 (2000).
217. Frezzolini, a *et al.* Circulating interleukin 16 (IL-16) in children with atopic/eczema dermatitis syndrome (AEDS): a novel serological marker of disease activity. *Allergy* **57**, 815–20 (2002).
218. Tanyasiri, K. *et al.* Interleukin-16 in patients with alopecia areata. *J. Dermatol. Sci.* **37**, 55–7 (2005).
219. Müller, S. *et al.* Activated CD4+ and CD8+ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. *Am. J. Pathol.* **152**, 261–8 (1998).
220. James, S. P., Fiocchi, C., Graeff, A. S. & Strober, W. Phenotypic analysis of lamina propria lymphocytes. Predominance of helper-inducer and cytolytic T-cell phenotypes and deficiency of suppressor-inducer phenotypes in Crohn's disease and control patients. *Gastroenterology* **91**, 1483–9 (1986).
221. Keates, A. C. *et al.* Interleukin 16 Is Up-regulated in Crohn's disease and participates in TNBS colitis in mice. *Gastroenterology* **119**, 972–982 (2000).
222. Seegert, D. *et al.* Increased expression of IL-16 in inflammatory bowel disease. *Gut* **48**, 326–32 (2001).
223. Glas, J., Török, H. P., Unterhuber, H., Radlmayr, M. & Folwaczny, C. The -295T-to-C promoter polymorphism of the IL-16 gene is associated with Crohn's disease. *Clin. Immunol.* **106**, 197–200 (2003).
224. Blaschke, S. *et al.* Interleukin 16 expression in relation to disease activity in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **28**, 12–21 (2001).
225. Kaufmann, J. *et al.* Correlation of circulating interleukin 16 with proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. **40**, 474–5 (2001).
226. Kageyama, Y. *et al.* Interleukin-16 in synovial fluids from cases of various types of arthritis. *Joint. Bone. Spine* **67**, 188–93 (2000).

227. Pritchard, J., Horst, N., Cruikshank, W. & Smith, T. J. Igs from patients with Graves' disease induce the expression of T cell chemoattractants in their fibroblasts. *J. Immunol.* **168**, 942–50 (2002).
228. Lee, S. *et al.* Circulating interleukin-16 in systemic lupus erythematosus. *Br. J. Rheumatol.* **37**, 1334–7 (1998).
229. Lee, S. & Sekigawa, I. Possible pathogenic role of IL-16 on SLE: with reference to HIV-1 infection. *Ryumachi.* **38**, 747–51 (1998).
230. Lard, L. R., Roep, B. O., Verburgh, C. A., Zwinderman, A. H. & Huizinga, T. W. J. Elevated IL-16 levels in patients with systemic lupus erythematosus are associated with disease severity but not with genetic susceptibility to lupus. *Lupus* **11**, 181–5 (2002).
231. Bever, C. T. *et al.* Changes in leukocyte recirculation, NK cell activity, and HLA-DR expression in peripheral blood mononuclear cells of MS patients treated with Poly ICLC. *Int. J. Immunopharmacol.* **13**, 613–8 (1991).
232. Merelli, E. *et al.* Natural killer cells and lymphocyte subsets in active MS and acute inflammation of the CNS. *Acta Neurol. Scand.* **84**, 127–31 (1991).
233. Kondo, T. *et al.* TCR repertoire to proteolipid protein (PLP) in multiple sclerosis (MS): homologies between PLP-specific T cells and MS-associated T cells in TCR junctional sequences. *Int. Immunol.* **8**, 123–30 (1996).
234. Peters, C., Lötzerich, H., Raabe-Oekter, A., Mucha, C. & Michna, H. Functional activity of immune cells in female MS-patients. *Ann. Anat.* **180**, 321–5 (1998).
235. Biddison, W. E. *et al.* Chemokine and matrix metalloproteinase secretion by myelin proteolipid protein-specific CD8+ T cells: potential roles in inflammation. *J. Immunol.* **158**, 3046–53 (1997).
236. Skundric, D. S. *et al.* Anti-IL-16 therapy reduces CD4+ T-cell infiltration and improves paralysis and histopathology of relapsing EAE. *J. Neurosci. Res.* **79**, 680–93 (2005).
237. Lai, W. S., Carballo, E., Thorn, J. M., Kennington, E. A. & Blackshear, P. J. Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to Au-rich elements and destabilization of mRNA. *J. Biol. Chem.* **275**, 17827–37 (2000).
238. Milke, L. *et al.* Depletion of tristetraprolin in breast cancer cells increases interleukin-16 expression and promotes tumor infiltration with monocytes/macrophages. *Carcinogenesis* **34**, 850–7 (2013).
239. Al-Ahmadi, W., Al-Ghamdi, M., Al-Souhibani, N. & Khabar, K. S. A. miR-29a inhibition normalizes HuR over-expression and aberrant AU-rich mRNA stability in invasive cancer. *J. Pathol.* **230**, 28–38 (2013).
240. Yellapa, A. *et al.* Association of interleukin 16 with the development of ovarian tumor and tumor-associated neoangiogenesis in laying hen model of spontaneous ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **22**, 199–207 (2012).
241. Qin, X.-J. *et al.* Interleukin-16 in tuberculous and malignant pleural effusions. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* **25**, 605–11 (2005).
242. Batai, K. *et al.* Fine-mapping of IL16 gene and prostate cancer risk in African Americans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **21**, 2059–68 (2012).
243. Compérat, E. *et al.* Tissue expression of IL16 in prostate cancer and its association with recurrence after radical prostatectomy. *Prostate* **70**, 1622–7 (2010).
244. Gao, L.-B. *et al.* The association of interleukin-16 polymorphisms with IL-16 serum levels and risk of colorectal and gastric cancer. *Carcinogenesis* **30**, 295–9 (2009).

245. Gao, L.-B. *et al.* Genetic polymorphism of interleukin-16 and risk of nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Chim. Acta.* **409**, 132–5 (2009).
246. Bellomo, G. *et al.* Serum levels of interleukin-16 in lymphoid malignancies. *Leuk. Lymphoma* **48**, 1225–7 (2007).
247. Asadullah, K. *et al.* IL-15 and IL-16 overexpression in cutaneous T-cell lymphomas: stage-dependent increase in mycosis fungoides progression. *Exp. Dermatol.* **9**, 248–51 (2000).
248. Yamanaka, K. *et al.* Expression of interleukin-18 and caspase-1 in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **12**, 376–82 (2006).
249. Qin, J. Z. *et al.* Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myc genes in cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood* **98**, 2778–83 (2001).
250. Qin, J. Z. *et al.* Constitutive and interleukin-7- and interleukin-15-stimulated DNA binding of STAT and novel factors in cutaneous T cell lymphoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 583–9 (2001).
251. Yamanaka, K. *et al.* Skin-derived interleukin-7 contributes to the proliferation of lymphocytes in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* **107**, 2440–5 (2006).
252. Döbbeling, U. *et al.* Interleukin-15 is an autocrine/paracrine viability factor for cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood* **92**, 252–8 (1998).
253. Marzec, M. *et al.* IL-2- and IL-15-induced activation of the rapamycin-sensitive mTORC1 pathway in malignant CD4+ T lymphocytes. *Blood* **111**, 2181–9 (2008).
254. Curiel-lewandowski, C. *et al.* Loss of nuclear pro – IL-16 facilitates cell cycle progression in human cutaneous T cell lymphoma. **121**, (2011).
255. Alexandrakis, M. G. *et al.* Serum level of interleukin-16 in multiple myeloma patients and its relationship to disease activity. *Am. J. Hematol.* **75**, 101–6 (2004).
256. Cao, Y. *et al.* The cytokine/chemokine pattern in the bone marrow environment of multiple myeloma patients. *Exp. Hematol.* **38**, 860–7 (2010).
257. Requena, L. *et al.* Cutaneous involvement in multiple myeloma: a clinicopathologic, immunohistochemical, and cytogenetic study of 8 cases. *Arch. Dermatol.* **139**, 475–86 (2003).
258. Procopiou, M. & Hugli, A. A 29-yr-old man with multiple myeloma presenting with subcutaneous masses. *Eur. J. Haematol.* **71**, 385–387 (2003).
259. Allegra, A. *et al.* Case report Serum levels of Interleukin-16 in a multiple myeloma patient with cutaneous involvement. 435–437 (2010).
260. Atanackovic, D. *et al.* Role of interleukin 16 in multiple myeloma. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 1005–20 (2012).
261. Massaia, M. *et al.* Detection of hyperreactive T cells in multiple myeloma by multivalent cross-linking of the CD3/TCR complex. *Blood* **78**, 1770–80 (1991).
262. Massaia, M. *et al.* Defective generation of alloreactive cytotoxic T lymphocytes (CTL) in human monoclonal gammopathies. *Clin. Exp. Immunol.* **73**, 214–8 (1988).
263. Dianzani, U. *et al.* Activated idiotype-reactive cells in suppressor/cytotoxic subpopulations of monoclonal gammopathies: correlation with diagnosis and disease status. *Blood* **72**, 1064–8 (1988).
264. Berridge, M. V & Tan, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 474–82 (1993).

265. Cockrell, A. S. & Kafri, T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol. Biotechnol.* **36**, 184–204 (2007).
266. Sakuma, T., Barry, M. a & Ikeda, Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem. J.* **443**, 603–18 (2012).
267. Kappes, J. C. & Wu, X. Safety considerations in vector development. *Somat. Cell Mol. Genet.* **26**, 147–58 (2001).
268. Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L. & Trono, D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* **15**, 871–5 (1997).
269. O.V. - plenti6_4_r4r2_v5_dest_map.pdf. at <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/vectors/plenti6_4_r4r2_v5_dest_map.pdf>
270. pTRIPZ_Technical_Manual.pdf. at <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/pTRIPZ_Technical_Manual.pdf>
271. Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J. K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8033–7 (1993).
272. Dull, T. *et al.* A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. **72**, (1998).
273. Frankel, a D. & Young, J. a. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 1–25 (1998).
274. Fehse, B., Kustikova, O. S., Bubenheim, M. & Baum, C. Poisson--it's a question of dose... *Gene Ther.* **11**, 879–81 (2004).
275. Kustikova, O. S. *et al.* Dose finding with retroviral vectors: correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. *Blood* **102**, 3934–7 (2003).
276. Schroeder, A. *et al.* The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* **7**, 3 (2006).
277. AffymetrixInc. Accurately measure mRNA and lincRNAs using most comprehensive arrays | Affymetrix. at <http://www.affymetrix.com/estore/browse/products.jsp?productId=131453#1_1>
278. Irizarry, R. a *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249–64 (2003).
279. Home | Ingenuity Systems. at <<http://www.ingenuity.com/>>
280. NEB. New England Biolabs Tm Calculator. at <<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator>>
281. Lim, K. G. *et al.* Lymphocyte. *J. Immunol.* **6**, 2–6 (1996).
282. MISSION® shRNA Vector Maps | Sigma-Aldrich. at <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/shrna/library-information/vector-map.html>>
283. Stewart, S. A. *et al.* Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. 493–501 (2003). doi:10.1261/rna.2192803.rapid

284. Amar, L., Desclaux, M., Faucon-Biguët, N., Mallet, J. & Vogel, R. Control of small inhibitory RNA levels and RNA interference by doxycycline induced activation of a minimal RNA polymerase III promoter. *Nucleic Acids Res.* **34**, e37 (2006).
285. Zeng, Y., Wagner, E. J., Cullen, B. R. & Carolina, N. Both Natural and Designed Micro RNAs Can Inhibit the Expression of Cognate mRNAs When Expressed in Human Cells Technique. **9**, 1327–1333 (2002).
286. Stegmeier, F., Hu, G., Rickles, R. J., Hannon, G. J. & Elledge, S. J. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13212–7 (2005).
287. Silva, J. M. *et al.* Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat. Genet.* **37**, 1281–8 (2005).
288. Chang, K., Elledge, S. J. & Hannon, G. J. Lessons from Nature : microRNA-based shRNA libraries. **3**, 707–714 (2006).
289. POLISENO, L., EVANGELISTA, M., GIACCA, M. & RAINALDI, G. Multi-Copy, Multi-siRNA Vectors as Versatile Tools for Multiple Gene Knock-Down Applications. *Mol. Ther.* **11**, 144–144 (2005).
290. Mackenzie, N. C., Lillico, S. G., Brown, K., Wolf, C. R. & Whitelaw, C. B. Evaluation of RNA-knockdown strategies for modulation of cytochrome P450 reductase activity in mouse hepatocytes. *J. RNAi Gene Silencing* **6**, 416–21 (2010).
291. Vogel, C. & Marcotte, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 227–32 (2012).
292. De Sousa Abreu, R., Penalva, L. O., Marcotte, E. M. & Vogel, C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol. Biosyst.* **5**, 1512–26 (2009).
293. Ashburner, M. *et al.* Gene Ontology : tool for the unification of biology. **25**, 25–29 (2011).
294. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **10**, 789–99 (2004).
295. Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J. & Matias-Guiu, X. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* **446**, 475–82 (2005).
296. Dhillon, a S., Hagan, S., Rath, O. & Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**, 3279–90 (2007).
297. Fuchs, O. Targeting of NF-kappaB signaling pathway, other signaling pathways and epigenetics in therapy of multiple myeloma. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets* **13**, 16–34 (2013).
298. Tu, Y., Gardner, A. & Lichtenstein, A. The Phosphatidylinositol 3-Kinase / AKT Kinase Pathway in Multiple Myeloma Plasma Cells : Roles in Cytokine-dependent Survival and Proliferative Responses The Phosphatidylinositol 3-Kinase / AKT Kinase Pathway in Multiple Myeloma Plasma Cells : Roles in C. 6763–6770 (2000).
299. RT² Profiler PCR Array Data Analysis. at <<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>>
300. ToppFun - Functional Enrichment. at <<http://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>>
301. Shi, Y. *et al.* IL-6-induced stimulation of c-myc translation in multiple myeloma cells is mediated by myc internal ribosome entry site function and the RNA-binding protein, hnRNP A1. *Cancer Res.* **68**, 10215–22 (2008).
302. Guo, Y., Xu, F., Lu, T., Duan, Z. & Zhang, Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat. Rev.* **38**, 904–10 (2012).

303. Hsu, J.-H. *et al.* Interleukin-6 activates phosphoinositol-3' kinase in multiple myeloma tumor cells by signaling through RAS-dependent and, separately, through p85-dependent pathways. *Oncogene* **23**, 3368–75 (2004).
304. Ishikawa, H. *et al.* Accelerated proliferation of myeloma cells by interleukin-6 cooperating with fibroblast growth factor receptor 3-mediated signals. *Oncogene* **24**, 6328–32 (2005).
305. Lauta, V. M. A review of the cytokine network in multiple myeloma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer* **97**, 2440–52 (2003).
306. Hardin, J. *et al.* Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. *Blood* **84**, 3063–70 (1994).
307. Lokhorst, H. M. *et al.* Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood* **84**, 2269–77 (1994).
308. Huff, C. A. & Matsui, W. Multiple myeloma cancer stem cells. *J. Clin. Oncol.* **26**, 2895–900 (2008).
309. Ghosh, N. & Matsui, W. Cancer stem cells in multiple myeloma. *Cancer Lett.* **277**, 1–7 (2009).
310. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991–8 (2002).
311. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **21**, 137–48 (2004).
312. Smyth, M. J., Dunn, G. P. & Schreiber, R. D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.* **90**, 1–50 (2006).
313. Glass, W. G., Sarisky, R. T. & Vecchio, A. M. Del. Not-so-sweet sixteen: the role of IL-16 in infectious and immune-mediated inflammatory diseases. *J. Interferon Cytokine Res.* **26**, 511–20 (2006).
314. Kovacs, E. The serum levels of IL-12 and IL-16 in cancer patients. Relation to the tumour stage and previous therapy. *Biomed. Pharmacother.* **55**, 111–6 (2001).
315. Albrecht, U. The mammalian circadian clock: a network of gene expression. *Front. Biosci.* **9**, 48–55 (2004).
316. Albrecht, U. & Eichele, G. The mammalian circadian clock. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 271–7 (2003).
317. Young, M. W. & Kay, S. a. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 702–15 (2001).
318. Panda, S. *et al.* Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109**, 307–20 (2002).
319. Ackermann, K. *et al.* Diurnal rhythms in blood cell populations and the effect of acute sleep deprivation in healthy young men. *Sleep* **35**, 933–40 (2012).
320. Kirsch, S. *et al.* T-cell numbers and antigen-specific T-cell function follow different circadian rhythms. *J. Clin. Immunol.* **32**, 1381–9 (2012).
321. Mazzocchi, G. *et al.* A timetable of 24-hour patterns for human lymphocyte subpopulations. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **25**, 387–95 (2011).
322. Fortier, E. E. *et al.* Circadian variation of the response of T cells to antigen. *J. Immunol.* **187**, 6291–300 (2011).

323. Silver, A. C., Arjona, A., Walker, W. E. & Fikrig, E. The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. *Immunity* **36**, 251–61 (2012).
324. Spengler, M. L. *et al.* Core circadian protein CLOCK is a positive regulator of NF- κ B-mediated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E2457–65 (2012).
325. Narasimamurthy, R. *et al.* Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 12662–7 (2012).
326. Hung, H.-C., Maurer, C., Zorn, D., Chang, W.-L. & Weber, F. Sequential and compartment-specific phosphorylation controls the life cycle of the circadian CLOCK protein. *J. Biol. Chem.* **284**, 23734–42 (2009).
327. Arjona, A. & Sarkar, D. K. Circadian oscillations of clock genes, cytolytic factors, and cytokines in rat NK cells. *J. Immunol.* **174**, 7618–24 (2005).
328. Keller, M. *et al.* A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21407–12 (2009).
329. Karantanos, T. *et al.* Expression of clock genes in patients with colorectal cancer. *Int. J. Biol. Markers* **28**, 280–285 (2013).
330. Mazzocchi, G. *et al.* Clock gene expression levels and relationship with clinical and pathological features in colorectal cancer patients. *Chronobiol. Int.* **28**, 841–51 (2011).
331. Klarenbeek, J. B., Goedhart, J., Hink, M. A., Gadella, T. W. J. & Jalink, K. A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PLoS One* **6**, e19170 (2011).
332. Shamma, M. A. *et al.* Dysfunctional homologous recombination mediates genomic instability and progression in myeloma. *Blood* **113**, 2290–7 (2009).
333. Ludwiczek, O. *et al.* Activation of caspase-3 by interferon alpha causes interleukin-16 secretion but fails to modulate activation induced cell death. *Eur. Cytokine Netw.* **12**, 478–86 (2009).
334. Sciaky, D., Brazer, W., Center, D. M., Cruikshank, W. W. & Smith, T. J. Cultured human fibroblasts express constitutive IL-16 mRNA: cytokine induction of active IL-16 protein synthesis through a caspase-3-dependent mechanism. *J. Immunol.* **164**, 3806–14 (2000).
335. Heuck, C. J. *et al.* Myeloma is characterized by stage-specific alterations in DNA methylation that occur early during myelomagenesis. *J. Immunol.* **190**, 2966–75 (2013).
336. Cho, R. J. *et al.* A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol. Cell* **2**, 65–73 (1998).
337. Ohtaki, M. *et al.* A robust method for estimating gene expression states using Affymetrix microarray probe level data. *BMC Bioinformatics* **11**, 183 (2010).
338. Wilson, K. C. *et al.* Regulation of nuclear Prointerleukin-16 and p27(Kip1) in primary human T lymphocytes. *Cell. Immunol.* **237**, 17–27 (2005).
339. Skundric, D. S., Zhou, W., Cruikshank, W. W. & Dai, R. Increased levels of bioactive IL-16 correlate with disease activity during relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Autoimmun.* **25**, 206–14 (2005).
340. Karin, M. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene* **18**, 6867–74 (1999).
341. Cantley, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655–7 (2002).
342. Garrington, T. P. & Johnson, G. L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 211–8 (1999).

343. Tu, Y., Gardner, A. & Lichtenstein, A. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Res.* **60**, 6763–70 (2000).
344. Van de Donk, N. W. C. J., Lokhorst, H. M. & Bloem, a C. Growth factors and antiapoptotic signaling pathways in multiple myeloma. *Leukemia* **19**, 2177–85 (2005).
345. Lacy, M. Q., Donovan, K. A., Heimbach, J. K., Ahmann, G. J. & Lust, J. A. Comparison of interleukin-1 beta expression by in situ hybridization in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Blood* **93**, 300–5 (1999).
346. Xiong, Y. *et al.* Identification of two groups of smoldering multiple myeloma patients who are either high or low producers of interleukin-1. *J. Interferon Cytokine Res.* **26**, 83–95 (2006).
347. Mizuno, T. & Rothstein, T. L. B cell receptor (BCR) cross-talk: CD40 engagement creates an alternate pathway for BCR signaling that activates I kappa B kinase/I kappa B alpha/NF-kappa B without the need for PI3K and phospholipase C gamma. *J. Immunol.* **174**, 6062–70 (2005).
348. Chng, W. J., Gualberto, A. & Fonseca, R. IGF-1R is overexpressed in poor-prognostic subtypes of multiple myeloma. *Leukemia* **20**, 174–6 (2006).
349. Rickard, S. E. *et al.* Dose-dependent production of mammalian lignans in rats and in vitro from the purified precursor secoisolariciresinol diglycoside in flaxseed. *J. Nutr.* **126**, 2012–9 (1996).
350. Frassanito, M. a. Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* **97**, 483–489 (2001).
351. Jernberg-Wiklund, H. & Nilsson, K. Targeting the IGF-1R signaling and mechanisms for epigenetic gene silencing in human multiple myeloma. *Ups. J. Med. Sci.* **117**, 166–77 (2012).
352. Hussein, M. *et al.* A phase I multidose study of dacetuzumab (SGN-40; humanized anti-CD40 monoclonal antibody) in patients with multiple myeloma. *Haematologica* **95**, 845–8 (2010).
353. Fizazi, K. *et al.* Randomised phase II study of siltuximab (CNTO 328), an anti-IL-6 monoclonal antibody, in combination with mitoxantrone/prednisone versus mitoxantrone/prednisone alone in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur. J. Cancer* **48**, 85–93 (2012).
354. Kim, J. *et al.* Macrophages and mesenchymal stromal cells support survival and proliferation of multiple myeloma cells. *Br. J. Haematol.* **158**, 336–46 (2012).
355. Tucci, M. *et al.* Immature dendritic cells in multiple myeloma are prone to osteoclast-like differentiation through interleukin-17A stimulation. *Br. J. Haematol.* **161**, 821–31 (2013).
356. Braga, W. M. T., Atanackovic, D. & Colleoni, G. W. B. The role of regulatory T cells and TH17 cells in multiple myeloma. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 293479 (2012).
357. Chu, V. T. & Berek, C. Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma cell survival. *Eur. J. Immunol.* **42**, 130–7 (2012).
358. Wong, T. W. *et al.* Induction of malignant plasma cell proliferation by eosinophils. *PLoS One* **8**, e70554 (2013).
359. DeNardo, D. G., Andreu, P. & Coussens, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 309–16 (2010).
360. Alexandrakis, M. G. *et al.* Serum interleukin-17 and its relationship to angiogenic factors in multiple myeloma. *Eur. J. Intern. Med.* **17**, 412–6 (2006).
361. Tucci, M. *et al.* Immature dendritic cells from patients with multiple myeloma are prone to osteoclast differentiation in vitro. *Exp. Hematol.* **39**, 773–83.e1 (2011).

362. Shen, C.-J., Yuan, Z.-H., Liu, Y.-X. & Hu, G.-Y. Increased numbers of T helper 17 cells and the correlation with clinicopathological characteristics in multiple myeloma. *J. Int. Med. Res.* **40**, 556–64 (2012).
363. Matsumoto, Y. *et al.* Immunosuppressive effect on T cell activation by interleukin-16- and interleukin-10-cDNA-double-transfected human squamous cell line. *Burns* **35**, 383–9 (2009).
364. Tong, A. W. *et al.* Anti-CD40 antibody binding modulates human multiple myeloma clonogenicity in vitro. *Blood* **84**, 3026–33 (1994).
365. Chiron, D. *et al.* Autocrine insulin-like growth factor 1 and stem cell factor but not interleukin 6 support self-renewal of human myeloma cells. *Blood Cancer J.* **3**, e120 (2013).
366. Tong, A. W. & Stone, M. J. CD40 and the effect of anti-CD40-binding on human multiple myeloma clonogenicity. *Leuk. Lymphoma* **21**, 1–8 (1996).
367. Kukreja, A. *et al.* Enhancement of clonogenicity of human multiple myeloma by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **203**, 1859–65 (2006).
368. Bournazou, E. & Bromberg, J. Targeting the tumor microenvironment: JAK-STAT3 signaling. *JAK-STAT* **2**, e23828 (2013).
369. Chen, P. & Bonaldo, P. Role of macrophage polarization in tumor angiogenesis and vessel normalization: implications for new anticancer therapies. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **301**, 1–35 (2013).

EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende akademische Abschlussarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Quellen übernommen habe, wurden von mir als solche gekennzeichnet.

Hamburg, den 10. Oktober 2013

Nachname: Templin

Vorname: Julia

Unterschrift: _____

PUBLIKATIONSLISTE

Atanackovic, D., H. Reinhard, S. Meyer, S. Spöck, T. Grob, T. Luetkens, S. Yousef, Y. Cao, Y. Hildebrandt, **J. Templin**, K. Bartels, N. Lajmi, H. Stoiber, N. Kröger, J. Atz, D. Seimetz, J. R. Izbicki, and C. Bokemeyer. The trifunctional antibody catumaxomab amplifies and shapes tumor-specific immunity when applied to gastric cancer patients in the adjuvant setting. *Human vaccines & immunotherapeutics* 9, (2013).

Atanackovic, D., Y. Hildebrandt, **J. Templin**, Y. Cao, C. Keller, J. Panse, S. Meyer, H. Reinhard, K. Bartels, N. Lajmi, O. Sezer, A. R. Zander, A. H. Marx, R. Uhlig, J. Zustin, C. Bokemeyer, and N. Kröger. Role of interleukin 16 in multiple myeloma. *Journal of the National Cancer Institute* 104, 1005–20 (2012).

Kobold, S., T. Luetkens, B. M. Bartels, Y. Cao, Y. Hildebrandt, O. Sezer, H. Reinhard, **J. Templin**, K. Bartels, N. Lajmi, F. Haag, C. Bokemeyer, N. Kröger, and D. Atanackovic. Longitudinal analysis of tetanus- and influenza-specific IgG antibodies in myeloma patients. *Clinical & developmental immunology* 2012, 134081 (2012).

Kobold, S., S. Tams, T. Luetkens, Y. Cao, O. Sezer, B. M. Bartels, H. Reinhard, **J. Templin**, K. Bartels, Y. Hildebrandt, N. Lajmi, A. Marx, F. Haag, C. Bokemeyer, N. Kröger, and D. Atanackovic. Patients with multiple myeloma develop SOX2-specific autoantibodies after allogeneic stem cell transplantation. *Clinical & developmental immunology* 2011, 302145 (2011).

Atanackovic, D., J. Panse, Y. Hildebrandt, A. Jadczyk, S. Kobold, Y. Cao, **J. Templin**, S. Meyer, H. Reinhard, K. Bartels, N. Lajmi, A. R. Zander, A. H. Marx, C. Bokemeyer, and N. Kröger. Surface molecule CD229 as a novel target for the diagnosis and treatment of multiple myeloma. *Haematologica* 96, 1512–20 (2011).

DANKSAGUNG

Eine Dissertation schreibt man allein! So musste ich es in der eidestattlichen Erklärung versichern. Doch ohne die professionelle und emotionale Unterstützung vieler kluger und lieber Menschen würde diese Doktorarbeit gewiss nicht in der Form existieren. Deshalb bin ich sehr froh, dass ich in diesem Abschnitt die Möglichkeit erhalte, mich bei allen zu bedanken, die mich während der letzten drei Jahre in meinem Vorhaben unterstützt haben.

Ein ganz besonderes und herzliches Dankeschön geht an

PD Dr. Djordje Atanackovic, Leiter des tumorimmunologischen Forschungslabors, für die Bereitstellung und Überlassung des spannenden und komplexen Forschungsthemas, die wissenschaftliche Betreuung, das Vertrauen in mich und die intensive Unterstützung.

Prof. Dr. Fiedler und Prof. Dr. Wienand für Ihre Bereitschaft, die Begutachtung meiner Dissertation zu übernehmen.

Meine Kollegen Katrin, Tim, Sara, Nesrine, Yan, York, Henrike, Steffi, Sabrina, Daniel und Eva für die unvergessliche Zeit im Labor, für eure Hilfsbereitschaft, für das gemeinsame Freuen und Ärgern, das Philosophieren über die Wissenschaft und das Leben. Mit meinen Fragen und Problemen blieb ich nie allein. Insbesondere danke ich Sara und Tim für die inspirierenden wissenschaftlichen Diskussionen, die wertvollen Anregungen, euer Engagement bei der kritischen Betrachtung der Dissertation sowie euren Optimismus und Zuspruch. Ihr habt mir damit wahnsinnig geholfen

Bioinformatiker Benjamin Otto für deine tolle Unterstützung speziell bei der Analyse der Microarrays sowie Bernd und Virgillio für die vielen Tipps und Hinweise zur Durchführung des *Life Cell Imagings*.

Meinen Freund Thomas für die nächtliche Bewachung im Labor, wenn ich mich mal wieder zu sehr gegruselt habe, für deine Bemühungen, meinen fachlichen Ausschweifungen mit Interesse zu folgen, obwohl dir spätestens beim zweiten Satz das Wort BAHNHOF in den Kopf geschossen kam, für dein unglaubliches Verständnis, häufig für Dinge zurückstecken zu müssen, die dir fremder nicht sein konnten.

Meine Familie und meine lieben Freunde! Ihr habt für den nötigen Ausgleich gesorgt und mir den Rücken freigehalten, mir Kraft gespendet, Mut zugesprochen und an mich geglaubt. Ihr seid die Besten!

Meine liebsten, klügsten und tollsten Großeltern, die mich gelehrt haben, auch in schweren Zeiten nicht aufzugeben und bis zum Schluss für seine Ziele zu kämpfen!