

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**Gezielte molekulare Therapie des Mantelzell-  
Lymphoms**  
***In vitro* Wirksamkeit von mTOR-Inhibitor RAD001  
und  
PNP-Inhibitor Forodesin+dGUO  
in Mono- und Kombinationstherapie**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Alina Postnik

aus  
Taschkent

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Dreyling

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Stefan Endres  
Priv. Doz. Dr. Ralf Schmidmaier  
Prof. Dr. Christoph Salat

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. biol. Marc Weinkauff

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINFÜHRUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1. DAS MANTELZELL-LYMPHOM .....	1
1.1.2 <i>Morphologie und Immunphänotypisierung</i> .....	2
1.1.3 <i>Zytogenetik und Molekulargenetik</i> .....	3
1.1.4 <i>Therapieverfahren</i> .....	4
1.2 MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN (MTOR) .....	5
1.2.1 <i>mTOR-Inhibitoren</i> .....	7
1.2.1.1 <i>Wirkungspunkte und Funktionsweise</i> .....	7
1.2.1.2 <i>Der mTOR-Inhibitor RAD001</i> .....	8
1.3 DER PNP-INHIBITOR FORODESIN.....	8
<b>2 ZIEL DIESER ARBEIT</b> .....	<b>10</b>
<b>3 MATERIALIEN DER ARBEIT</b> .....	<b>11</b>
3.1 ZELLINIEN-KLASSIFIZIERUNG .....	11
3.2 INHIBITOREN UND ZYTOSTATIKA .....	12
3.3 LÖSUNGEN UND PUFFER.....	12
3.4 HILFSMITTEL UND GERÄTE.....	13
3.5 SOFTWARE UND EDV .....	13
<b>4 METHODEN DER ARBEIT</b> .....	<b>14</b>
4.1 ZELLKULTURARBEITEN.....	14
4.2 DER TRYPANBLAU-AUSSCHLUSS-TEST.....	14
4.3 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN .....	15
4.3.1 <i>Funktionsweise des Durchflusszytometers (FACS Gerät)</i> .....	15
4.3.2 <i>Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid-Färbung</i> .....	15
4.3.3 <i>FACS-Analyse der Apoptose mit Annexin V-PE- und 7-AAD-Färbung</i> .....	16
4.4 BERECHNUNG DER FRACTION OF PRODUCT.....	17
4.5 STATISTISCHE AUSWERTUNGEN.....	18
<b>5 ERGEBNISSE</b> .....	<b>19</b>
5.1 PROLIFERATIONSHEMMUNG DURCH DEN mTOR-INHIBITOR RAD001.....	19
5.2 INDUKTION EINES ZELLYKLUSARRESTS VON MCL-ZELLINIEN DURCH RAD001 .....	22
5.3 APOPTOSEVERHALTEN VON MCL- UND T-ALL ZELLINIEN NACH DER BEHANDLUNG MIT RAD001 ..	23
5.4 KOMBINATION VON RAD001 MIT KONVENTIONELLER CHEMOTHERAPIE UND MOLEKULAREN ANSÄTZEN .....	25
5.4.1 <i>Kombination von RAD001 und Cytarabin</i> .....	26
5.4.2 <i>Kombination von RAD001 und Bendamustin</i> .....	26
5.4.3 <i>Kombination von RAD001 und Fludarabin</i> .....	27
5.4.4 <i>Kombination von RAD001 und Bortezomib</i> .....	28
5.4.5 <i>Kombination von RAD001 und Enzastaurin</i> .....	28
5.5 AUSWIRKUNG AUF DEN ZELLYKLUS UND APOPTOSE DURCH RAD001 IN KOMBINATION MIT BENDAMUSTIN, BORTEZOMIB UND FLUDARABIN .....	29
5.5.1 <i>Zellzyklusanalyse</i> .....	29
5.5.2 <i>Apoptoseanalyse</i> .....	31
5.6 PROLIFERATIONSHEMMUNG DURCH DEN PNP-INHIBITOR FORODESIN+DGUO.....	32
5.7 AUSWIRKUNG AUF DEN ZELLYKLUS DURCH FORODESIN+DGUO.....	33
5.8 APOPTOSEVERHALTEN VON MCL- UND T-ALL-ZELLINIEN NACH DER BEHANDLUNG MIT FORODESIN+DGUO .....	34
5.9 KOMBINATION VON FORODESIN+DGUO MIT KONVENTIONELLER CHEMOTHERAPIE UND MOLEKULAREN ANSÄTZEN .....	35
5.9.1 <i>Kombination von Forodesin+dGuo und Cytarabin</i> .....	36
5.9.2 <i>Kombination von Forodesin+dGuo und Bendamustin</i> .....	36
5.9.3 <i>Kombination von Forodesin+dGuo und Fludarabin</i> .....	37
5.9.4 <i>Kombination von Forodesin+dGuo und Bortezomib</i> .....	38
5.9.5 <i>Kombination von Forodesin+dGuo und Enzastaurin</i> .....	38
5.9.6 <i>Kombination von Forodesin+dGuo und RAD001</i> .....	39

<b>6 DISKUSSION .....</b>	<b>40</b>
6.1 WIRKUNG VON RAD001 AUF HUMANE MANTELZELL-LYMPHOM-ZELLINIEN.....	40
6.2 WIRKUNG VON FORODESIN+D <sup>2</sup> GUO AUF HUMANE MANTELZELL-LYMPHOM-ZELLINIEN .....	45
<b>7 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>50</b>
<b>8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>53</b>
<b>9 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>55</b>
<b>10 DANKSAGUNG .....</b>	<b>62</b>

## 1 Einführung

### 1.1. Das Mantelzell-Lymphom

Das Mantelzell-Lymphom (MCL) wurde in den 70-er Jahren erstmals als zentrozytisches Lymphom (CCL) durch Karl Lennert von anderen Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) abgegrenzt (Weissinger et al., 1997), (Harris et al., 1999).

Die Neuerkrankungsrate liegt bei 2-3/100000 Einwohnern (Lenz et al., 2004; Zucca et al., 1995). MCL kommt signifikant häufiger bei Männern vor, der Altersmedian liegt bei 60 Jahren (Jares et al., 2007b).

Die mediane Überlebenszeit liegt zwischen drei und vier Jahren (Bertoni and Ponzoni, 2007a). Das MCL wird bei 85% der Patienten in den fortgeschrittenen Ann-Arbor-Stadien III oder IV mit generalisierter Adenopathie (71%-90%) (Fisher, 1996) und Knochenmarkinfiltration (60-80%) (Hiddemann, 2004) diagnostiziert.

Klinisch manifestiert sich häufig eine Hepatosplenomegalie (35%–55%). Des weiteren betroffene Organe sind Lunge und/oder Pleura (17%), Gastrointestinaltrakt (25%) (Hiddemann and Dreyling, 2003) oder Waldeyer´scher Rachenring (10%) (Swerdlow and Williams, 2002). Ungünstige Prognosefaktoren sind fortgeschrittenes Alter und Stadium (Ann-Arbor III/IV), eingeschränkter Performance Status, KM-Befall, LDH über 450 U/L, aber auch molekulare Faktoren, wie eine p53-Überexpression (Lenz et al., 2004). Von herausragender Bedeutung ist die proliferative Aktivität, gemessen als „mitotic index“ oder mittels Ki-67-Färbung an Gewebeproben (Katzenberger et al., 2006). Dieser Index (Prozentsatz von Ki-67 positiven Tumor-Zellen) korreliert mit dem Niveau der Cyclin D1-Expression und anderen Zellzyklus-Regulatoren (Klapper et al., 2009).

### 1.1.2 Morphologie und Immunphänotypisierung

Beim MCL lassen sich zytologisch zwei Varianten unterscheiden, das klassische MCL (Abb.1 A1) und die aggressivere blastoide Variante (Abb.1 B1) (Ohtsubo et al., 2004), (Bertoni and Ponzoni, 2007a).

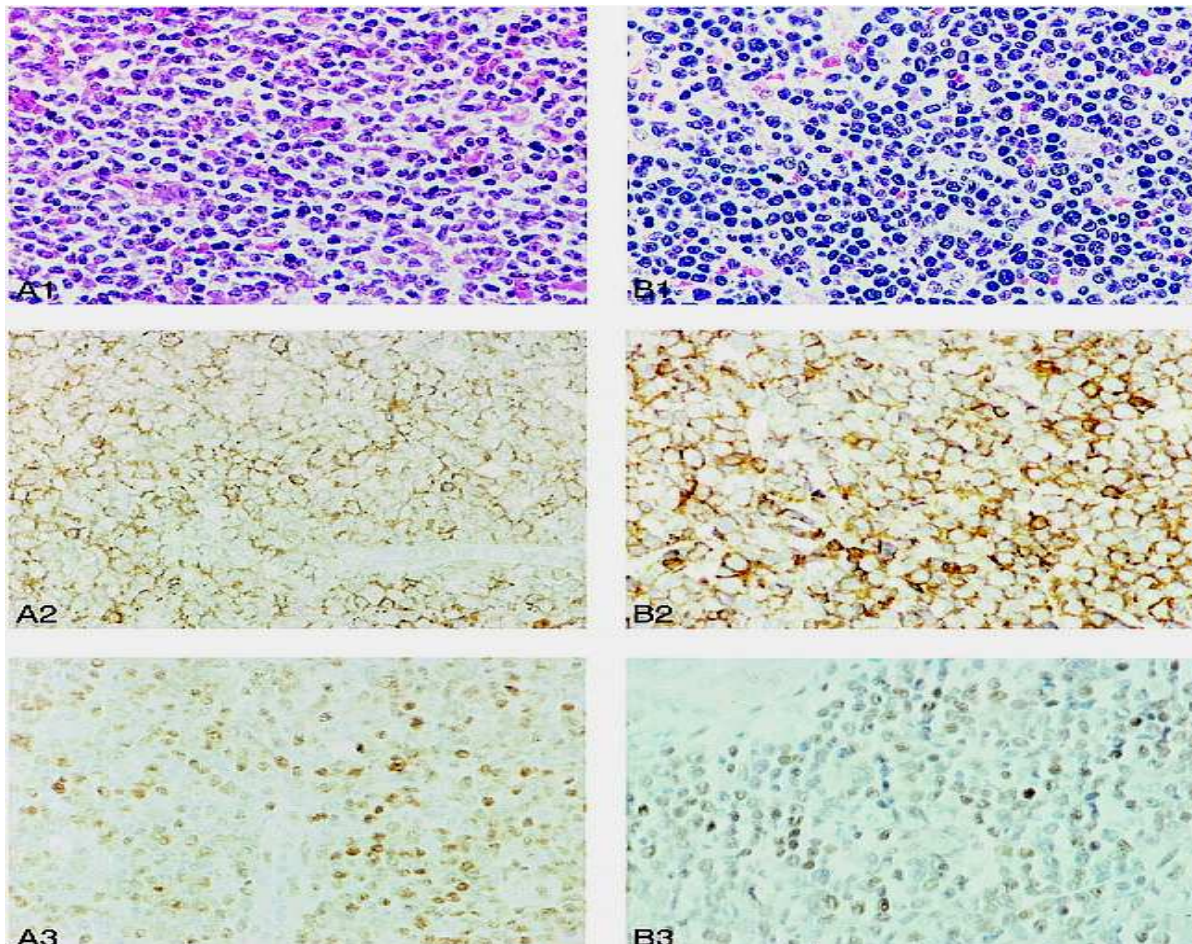


Abbildung 1: Mantelzell-Lymphom - klassische (A1) und blastoide (B1) Varianten. Eine monotone Population von kleinen Zellen mit ein wenig unregelmäßigen Kernkonturen ist für das klassische MCL (A1) typisch. Bei der blastoiden Variante sind die Kerne in der Größe, Gestalt, und dem Chromatin-Muster variabler (B1). Die malignen Zellen sind in der Regel diffus oder angedeutet nodulär im Lymphknotengewebe angeordnet. Die MCL-Zelle ist meist für CD5 (A2, B2) und fast immer Cyclin D1 (A3, B3) positiv (Vergrößerung 1×375) (Sources, 1999).

Im Gegensatz zur klassischen Variante zeigt das blastoide MCL einen deutlich gesteigerten mitotischen Index, der meist etwa 40–80% beträgt (Hao et al., 2002).

Diese Variante zeigt ein aggressiveres klinisches Verhalten mit einer mittleren Überlebenszeit von drei Jahren (Jares et al., 2007a).

In der Immunhistologie zeigen MCL-Zellen einen charakteristischen Phänotyp reifer B-Lymphozyten. Neben der Expression der nativen B-Zell Marker CD19+, CD20+, CD22+, CD24+, CD45+ und CD79a+ tragen die Tumorzellen fast immer Oberflächen-IgM und meistens zusätzlich IgD, nicht aber IgG oder IgA (Sources, 1999). Zusätzlich dazu weisen MCL-Zellen eine Koexpression des T-Zell-Antigens CD5 auf (Swerdlow and Williams, 2002).

### **1.1.3 Zytogenetik und Molekulargenetik**

Das genetische Kennzeichen des MCL ist eine Translokation t(11;14)(q13;q32) in 85–90% der Fälle (Bertoni and Ponzoni, 2007a), (Peponi et al., 2006), die zu einer Überexpression von Cyclin D1 führt (Rummel et al., 2004), (Jares et al., 2007b).

Cyclin D1 ist ein Proto-Onkogen und beteiligt sich an der Kontrolle der G1-Phase des Zellzyklus. Die Hyperphosphorylierung des Retinoblastom-Proteins durch Cyclin D1-CDK4 und Cyclin D1-CDK6 führt zur Freisetzung von E2F-Transkriptionsfaktoren und einer Expression von Genen, die in der S-Phase aktiv sind (Hirama and Koeffler, 1995), (Jares et al., 2007a), (Jares and Campo, 2008). Das Ergebnis ist eine Deregulierung an der Transitionskontrolle G1-S im Zellzyklus und eine gesteigerte Tumor-Zellproliferation (Fernandez et al., 2005), (Jares et al., 2007b).

Zusätzlich tragen MCL-Tumor-Zellen eine hohe Anzahl von sekundären chromosomalen und molekularen Modifizierungen von Proteinen, die den Zellzyklus und die Zell-Seneszenz (BMI1, INK4a, CDK4 und RB1) regeln und die Zellantwort auf den DNA-Schaden (ATM, CHK2 und p53) stören (Jares et al., 2007b).

Speziell bei MCL sind zusätzlich NF- $\kappa$ B, PI3K/AKT und mTOR-Wege aktiviert (Bertoni and Ponzoni, 2007b), (Jares and Campo, 2008), (Drakos et al., 2009)

### 1.1.4 Therapieverfahren

Das Mantelzell-Lymphom weist das schlechteste langfristige Überleben aller B-Zell-Lymphome auf. Folglich ist eine wait-and-see Strategie in der Regel nicht gerechtfertigt. Verschiedene herkömmliche chemotherapeutische Regime erreichen Ansprechraten von ca. 70%, komplette Remissionen werden in 20%-40% der Fälle beobachtet (Lenz et al., 2004), (Howard et al., 2002).

Die Behandlungsstrategie bei neu diagnostizierten Patienten mit MCL hängt primär von der Eignung des Patienten für die Stammzelltransplantation (SCT) ab (Abb.2). Geeignete Patienten werden gewöhnlich mit dem R-CHOP-Regime, gefolgt von SCT oder einer intensivierten Kombinationschemotherapie R-Hyper-CVAD behandelt (Witzig, 2005).

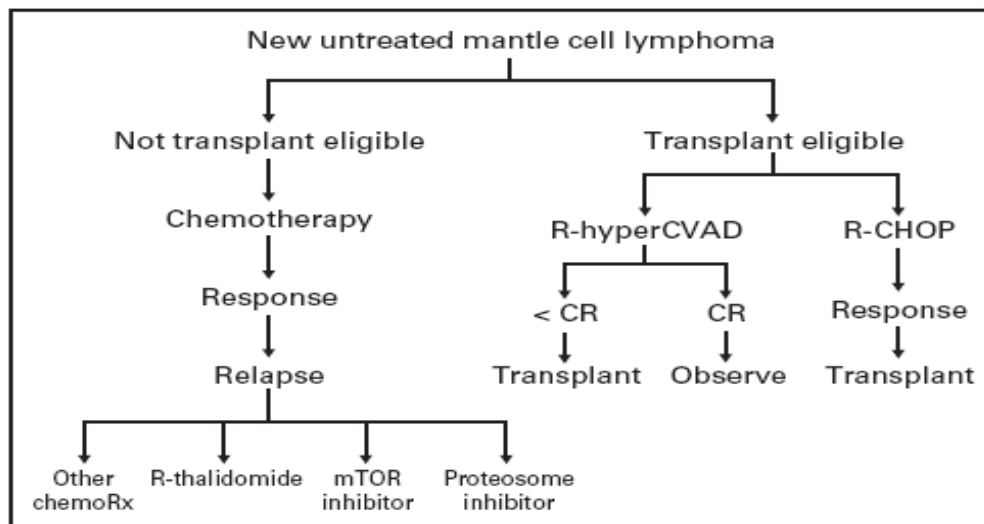


Abbildung 2: Übersicht über die konventionelle Therapie des MCL.

R-Hyper-CVAD (Rituximab, Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin und Dexamethason);

R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison); CR complete remission;

mTOR (mammalian target of rapamycin) (Witzig, 2005).

Bis jetzt bildet die allogene SCT den einzigen kurativen Therapieansatz beim fortgeschrittenen oder beim rezidierten MCL (Witzig, 2005), (Khoury et al., 2003), (Dreyling et al., 2007), (Dreyling and Hiddemann, 2008), (Klapper et al., 2009).

Der Einsatz monoklonaler Antikörper in Ergänzung zu konventionellen Schemata scheint in der Initialtherapie des MCL zu einer deutlichen Verbesserung zu führen. Nach R-CHOP wird ein Gesamtansprechen von 94% der behandelten Patienten beobachtet, da-



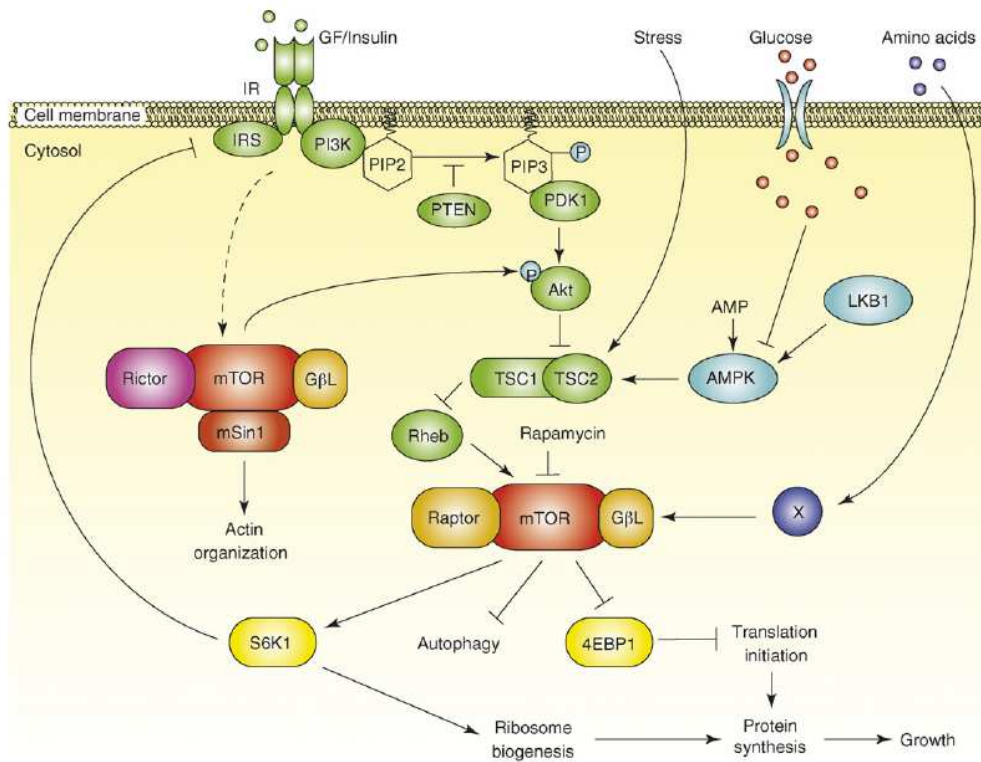
von einer kompletten Remissionsrate (34% CR) im Vergleich zu einer Ansprechrate bei alleiniger CHOP-Therapie bei nur 77% der Patienten (9% CR) (Dreyling et al., 2007).

Trotz einer breiten Auswahl an Therapiemöglichkeiten ist das Mantelzell-Lymphom häufig nicht heilbar. Somit sind neue Therapiestrategien dringend erforderlich, um die Langzeitprognose des Mantelzell-Lymphoms zu verbessern (Dreyling and Hiddemann, 2008). Neue Möglichkeiten ergeben sich durch den Einsatz von molekularen Tumortherapeutika, der „targeted therapy“. Das Therapieprinzip zielt auf deregulierte Signaltransduktionen. Beispiele für eine „targeted therapy“ sind Proteasome, Histone-Deacetylase (HDAC) und Hitzeschockprotein 90 (Hsp90)-Inhibitoren (Obrador-Hevia et al., 2009).

Zurzeit befinden sich unterschiedliche „targeted“ Therapieansätze bei MCL in der präklinischen Erprobung oder klinischen Prüfung. Der Cyclin-D1-Inhibitor Flavopiridol (Kouroukis et al., 2003), der Proteasom-Inhibitor Bortezomib (Goy et al., 2009; Suh and Goy, 2008), diverse Immunmodulatoren wie Thalidomid, Anthrazyklinderivate wie Pixantron (BBR 2778) und mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin (Sirolimus®), CCI-779 (Temsirolimus®) oder RAD001 (Everolimus®) (Fisher et al., 2004), (Ghielmini and Zucca, 2009). Temsirolimus® ist erst kürzlich für die Behandlung des rezidivierenden Mantelzell-Lymphoms in der EU zugelassen worden (Weniger and Wiestner, 2011).

### 1.2 Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)

**mTOR** *mammalian Target of Rapamycin* ist Bestandteil eines Proteinkomplexes, der unterschiedliche extrazelluläre und intrazelluläre Signalwege von Wachstumsfaktoren einer Zelle integriert. Dabei fungiert mTOR als eine Serin-/Threonin-Kinase, die mehrere andere Proteine und Enzyme phosphoryliert und aktiviert (Abb. 3) (Tsang et al., 2007), (Thomson et al., 2009).



**Abbildung 3:** mTOR integriert Eingangssignale von Wachstumsfaktoren (GF), Nährstoffen (Glukose und Aminosäuren) und Stress, um das Zellwachstum via verschiedene Zellprozesse zu regeln. Pfeile und Balken repräsentieren die Aktivierung bzw. Hemmung. Das Protein X ist ein unbekannter Mediator (Tsang et al., 2007).

mTOR enthält mindestens zwei strukturell und funktionell verschiedene Multiproteinkomplexe, sogenannte mTORC1 und mTORC2, die parallel regulierte Signalwege beinhalten (Chiang and Abraham, 2007), (Thomson et al., 2009).

Ein aktivierter mTORC1 führt zur Phosphorylierung von zwei gut charakterisierten Effektoren des mTOR-Signalwegs, dem eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) und der p70-ribosomalen Proteinkinase S6 (p70S6K) (Abb. 3) (Tsang et al., 2007), (Peponi et al., 2006). Die Aktivierung des Initiationsfaktors eIF4F durch mTOR initiiert eine Translation des cap-abhängigen mRNAs und fördert die Synthese mehrerer Proteine, welche den G1-Kontrollpunkt des Zellzyklus regulieren (Panwalkar et al., 2004), (Peponi et al., 2006).

Die Aktivierung von p70S6K durch mTOR, die ihrerseits das Protein S6 der 40s-Ribosomenuntereinheit phosphoryliert, führt zu einer Synthese von ribosomalen Proteinen und zu einer gesteigerten mRNA-Translation (Schliess et al., 2006), (Hannan et al., 2003), (Panwalkar et al., 2004).

Der mTOR-Komplex 2 aktiviert die onkogene Kinase AKT durch die Phosphorylierung an der Ser473-Position. Die Aktivierung von AKT steuert das Zellwachstum und die Proliferation. Außerdem reguliert mTORC2 die Proteinkinase C- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ ) und beteiligt sich an der Zytoskelett-Reorganisation (Chiang and Abraham, 2007).

### **1.2.1 mTOR-Inhibitoren**

#### **1.2.1.1 Wirkungspunkte und Funktionsweise**

Der mTOR-Inhibitor Rapamycin, wurde im Jahr 1999 als ein Immunsuppressivum zugelassen (Bjornsti and Houghton, 2004). Rapamycin und seine Abkömmlinge - Temsirolimus (CCI-779), Deforolimus (AP23573) und Everolimus (RAD001) - hemmen auch die Tumor-Zellproliferation (Dancey, 2006), (Hess et al., 2009).

In empfindlichen Zelllinien hemmen die Rapamycin-Analoga eine Tumor-Zellproliferation in pikomolaren bis nanomolaren Konzentrationen *in vitro* (Haritunians et al., 2007), (Jundt et al., 2005), (Tamburini et al., 2008), (Crazzolara et al., 2009), (Majewski et al., 2000), (Aguirre et al., 2004).

Hemmstoffe von mTOR verhindern auch die Aktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), hemmen die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins und beschleunigen den Umsatz von Cyclin D1 (Sabatini, 2006), (Alao, 2007). Zudem führen sie zu einer Zunahme der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21Kip1 und p27Kip1 und induzieren somit ein Defizit an aktiven CDK4/Cyclin D1-Komplexen, was zu einem G1-Phase-Arrest führt (Chiang and Abraham, 2007). In ausgewählten Modellen veranlassen Hemmstoffe von mTOR sogar eine Apoptose (Dancey, 2006), (Panwalkar *et al.*, 2004).

Die primäre Nebenwirkung der mTOR-Hemmer bei Erwachsenen sind dosisabhängige Hyperlipidämie, Hautreaktionen und Mucositis (Tsang et al., 2007), (Dancey, 2006).

### 1.2.1.2 Der mTOR-Inhibitor RAD001

RAD001 (Everolimus, Certican®) oder 42-O-(2-hydroxyethyl) Rapamycin ist ein Abkömmling von Rapamycin (Sirolimus) mit einem molekularen Gewicht von 958.25 Dalton (Abb. 4).

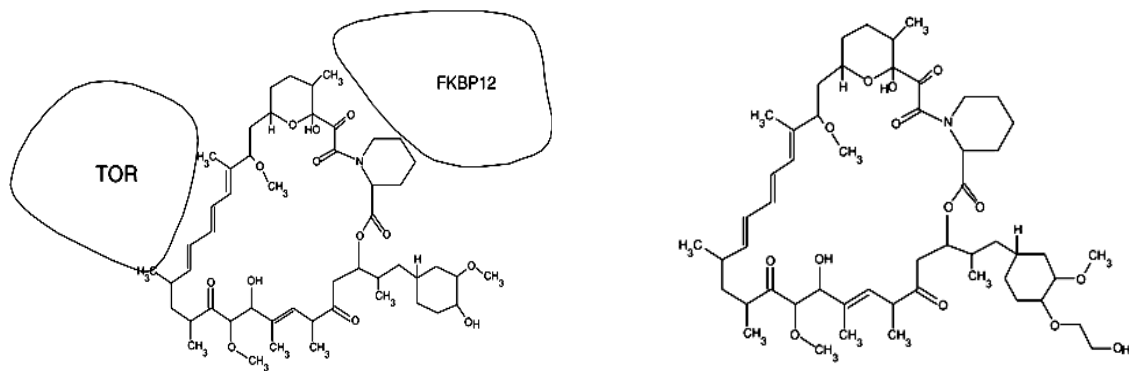


Abbildung 4: Chemische Struktur von Rapamycin (Sirolimus) rechts und ebenso 40-O-(2-hydroxyethyl)-Rapamycin (Everolimus) links.

RAD001 findet derzeit seine Anwendung unter anderem beim Nierenzellkarzinom, bei neuroendokrinen Tumoren, Brustkrebs, beim hepatozellulären Carcinom, kolorectalen Adenocarcinomen, Lymphomen und beim multiplen Myelom (Haritunians et al., 2007), (Witzig and Kaufmann, 2006).

### 1.3 Der PNP-Inhibitor Forodesin

Forodesin ist ein neuer Purin-Nukleosid-Phosphorylase-Inhibitor.

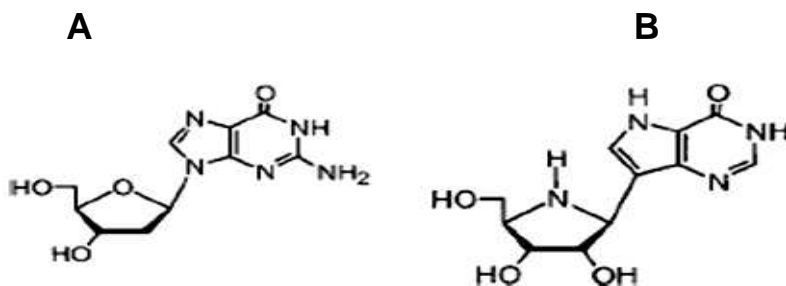


Abbildung 5: Chemische Struktur von **A** dGuo und **B** Forodesin (1-(9-deazahypoxanthin)-1,4-dideoxy-1,4-imino-D-ribitol).

Am Wirkmechanismus von Forodesin sind zwei Enzyme beteiligt: PNP und Desoxycytidin-Kinase (dCK). Unter physiologischen Bedingungen wird dGuo durch PNP phosphoryliert. Das Enzym Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP) katalysiert die Phosphorylierung von 2'-Desoxyguanosin (dGuo) zu Guanin (Gu) und zu einem 2'-Desoxyribose-1-Phosphat. Wenn PNP durch Forodesin gehemmt wird, wird dGuo durch das Enzym Desoxycytidin-Kinase (dCK) zu Desoxyguanosin-5'-Monophosphat (dGMP) und schließlich zu Desoxyguanosin-5'-Triphosphat (dGTP) umgewandelt, was zu einer Hemmung der Ribonukleotidreduktase führt, einem Enzym, das für die DNA-Synthese erforderlich ist (Korycka et al., 2007), (Bantia et al., 2003).

Alle PNP-Inhibitoren zeigen viel versprechende antineoplastische Wirkungen bei Patienten mit einer rezidierten oder therapieresistenten akuten lymphatischen Leukämie (ALL). Forodesin (Abb. 5) wird bei kutanen T-Zell-Lymphomen (CTCL), sowie bei rezidierten und therapieresistenten T- und B-Zell-Leukämien eingesetzt (Korycka et al., 2008), (Bieghs et al., 2010).

## 2 Ziel dieser Arbeit

Das Mantelzell-Lymphom zeichnet sich durch eine infauste Prognose mit einem nur kurzzeitigen Ansprechen auf Chemotherapeutika aus.

Die Behandlung ist sowohl mit einer konventionellen Chemotherapie als auch mit anderen Therapieansätzen, wie einer autologen Stammzelltransplantation oder einer Kombination mit dem Anti-CD20-Antikörper Rituximab, problematisch, da die meisten Patienten im weiteren Verlauf rezidivieren.

Diese Arbeit hatte zum Ziel, präklinische Daten bezüglich der Wirkung des mTOR-Inhibitors RAD001 und des Purin-Nukleosid-Phosphorylase-Inhibitors Forodesin in Gegenwart von 2'-Desoxyguanosin (dGuo) auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten von Mantelzell-Lymphom-Zellen zu erheben. Im Besonderen stellte sich die Frage, ob durch eine Dosissteigerung von RAD001 und Forodesin+dGuo ein zellschädigender Effekt erzielt werden könnte. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Kombination von RAD001 und Forodesin+dGuo mit etablierten Substanzen der Chemotherapie, dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib und dem PKC $\beta$ -Inhibitor Enzastaurin, zu einem synergistischen Effekt führen kann. Dazu wurden sechs Mantelzell-Lymphom-Zelllinien und eine T-Zell-Lymphom-Zelllinie als Kontrollzelllinie untersucht.

Die behandelten Zellen wurden einem Viabilitäts-Trypanblau-Test zugeführt, um die Zytotoxizität unterschiedlicher Dosen in Einzel- und Kombinationstherapie zu quantifizieren. Diese Ergebnisse wurden anschließend mit Hilfe der Zellzyklusanalyse durch Propidiumiodid-Färbung und Apoptose-Assays verifiziert.

### 3 Materialien der Arbeit

#### 3.1 Zelllinien-Klassifizierung

Die in der Arbeit verwendeten Zelllinien sind die etablierten humanen MCL-Zelllinien Granta 519, HBL-2, Jeko-1, Z 138 und Rec-1, NCEB-1 sowie die Kontrollzelllinie Jurkat (humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie).

	MCL-Zelllinien					
Charakterisierung	Granta 519	Jeko-1	Rec-1	Z 138	HBL-2	NCEB-1
<b>Alter, Geschlecht, Entnahmeort</b>	<b>58, w, PB</b>	<b>78, w, PB</b>	<b>61, m, LK</b>	<b>70, m, BM</b>	<b>84, m, LK</b>	<b>57, m, PB</b>
<b>Verdopplungszeit</b>	<b>49h</b>	<b>50h</b>	<b>20-40h</b>	<b>18-24h</b>	<b>36h</b>	<b>72-96h</b>
<b>t(11;14)(q13;q32)</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>κ/λ</b>	<b>n.a.</b>	<b>n.a.</b>	<b>n.a.</b>	<b>λ</b>	<b>λ</b>	<b>λ</b>
<b>Cyclin D1</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>
<b>CD5</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>n.a.</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>CD20</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>CD10</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>CD23</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>n.a.</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>EBV</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>n.a.</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>p16</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>n.a.</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>RB</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>n.a.</b>	<b>n.a.</b>	<b>n.a.</b>	<b>n.a.</b>
<b>Bcl-2</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>n.a.</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Bax</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>n.a.</b>	<b>n.a.</b>	<b>n.a.</b>	<b>n.a.</b>

Tabelle 1: Charakteristika der MCL-Zelllinien nach Drexler et al.; 2000, 2002, 2006, nach Amin et al. 2003, nach C. Rudolph et al. 2004, und nach Campo et al., 2006 sowie <http://www.dsmz.de/>

Abkürzungen: w=weiblich, m=männlich, PB=peripheres Blut, LK=Lymphknoten, n.a.=not available (Salaverria et al., 2006), (Drexler and MacLeod, 2006), (Rudolph et al., 2004), (Amin et al., 2003)

Alle Zelllinien wurden von American Type Culture Collection (ATCC), LGC Promochem (Wesel, Deutschland) und von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) (Braunschweig, Deutschland) erworben.

### 3.2 Inhibitoren und Zytostatika

Therapeutikum	Hersteller	Konzentrationen <i>in vitro</i>
RAD001 Vorratslösung à 20 nM in DMSO	Novartis (Basel, Schweiz)	0,2-20000 nM/ml
Forodesin	BioCryst Pharmaceuticals (Birmingham, Alabama, USA)	0,1-10 µM/ml
dGuo	wie Forodesin	0,1-1 µM/ml
Bortezomib Vorratslösung à 100 nM in Aqua dest.	Millenium (Cambridge, MA, USA)	5 nM/ml
Enzastaurin Vorratslösung à 10 nM in Aqua dest.	Eli Lilly (Indiana, USA)	10 µM/ml

Die folgenden Lösungen wurden in der zentralen Apotheke des Universitätsklinikums München Großhadern angesetzt:

Zytostatikum	Hersteller	Verwendete Konzentrationen in den Versuchen
Fludarabin	Actavis Dtl. GmbH & Co KG	0,25 µg/ml
Bendamustin	Thymoorgan GmbH	5 µg/ml
Cytarabin	Hexal AG	2,5 µg/ml

### 3.3 Lösungen und Puffer

Die Zellkulturmedien RPMI-1640 und alle benötigten Medienzusätze wurden von PAN-Biotech (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) bezogen.

#### Kommerzielle Kits:

Annexin V-PE	BD Biosciences Pharmingen
7-AAD (7-Amino-Actinomycin D)	BD Biosciences Pharmingen
Annexin V Binding Buffer	BD Biosciences Pharmingen



WST–1 Cell Proliferation Reagent      Roche Deutschland

### 3.4 Hilfsmittel und Geräte

Durchflußzytometer: BD FACS Calibur      BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA

Begasungsbrutschrank (CO2-Auto-Zero)      W. C. Heraeus GmbH Hanau, Deutschland

Mikroskop  
Lichtmikroskop      Carl Zeiss Jena, Deutschland  
Opto Sonderbedarf GmbH München, Deutschland

Zentrifugen:  
Centrifuge 5415D, Rotanta 46RC      Hettich Zentrifugen Eppendorf, Deutschland

### 3.5 Software und EDV

CalcuSyn 2.0      Biosoft (Cambridge, UK)

EndNote<sup>®</sup> X2      Thompson ISI Researchsoft (Carlsbad, CA, USA)

ModFit LTTM for Mac      Verity Software House (Topsham, ME, USA)

MS-Office 2007 SP2      Microsoft (Redmond, WA, USA)

WinMDI 2.8      Joseph Trotter (TRSI, La Jolla, CA, USA)

Cellquest      Becton Dickinson (Mountain View, CA, USA)

FlowJo      Tree Star Inc. (San. Carlos, CA, USA)

## 4 Methoden der Arbeit

### 4.1 Zellkulturarbeiten

Die Zellkulturarbeiten wurden an sterilen Werkbänken mit vertikalem Luftstrom (Laminar Flow) durchgeführt. Alle Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 90% Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% in Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) kultiviert.

Granta 519, Jeko-1, NCEB-1, Rec-1 und Z 138 wurden in einem RPMI-1640 Medium kultiviert, das mit 20% fetalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. HBL-2 und Jurkat wurden in einem RPMI-1640 Medium mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin angesetzt.

### 4.2 Der Trypanblau-Ausschluss-Test

Alle Zellzählungen erfolgten in einer Neubauer-Zählkammer. Zur Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen wurde eine Färbung der Zellen mit dem polyanionischen Farbstoff Trypanblau durchgeführt. Trypanblau kann sich nur in irreversibel geschädigten Zellen anreichern und führt zu einer Blaufärbung dieser Zellen. Die Zellzahl in der Zellsuspension wurde anhand folgender Formeln berechnet:

1. Gesamtzellzahl= $n \times V_f \times V \times 10^4$

2. Lebendzellzahl= $m \times V_f \times V \times 10^4$

3. Vitalität [%]= $\text{Lebendzellzahl} / \text{Gesamtzellzahl} \times 100$  [%]= $m/n \times 100$  [%]

n: Anzahl der Zellen in einem ausgezählten Quadrat oder durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat, wenn mehrere Felder ausgezählt werden

m: Anzahl der lebenden Zellen in einem Quadrat oder durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat

V<sub>f</sub>: Verdünnungsfaktor

V: Volumen der Zellsuspension

10<sup>4</sup>: Kammerfaktor

Die Durchführung der Zellzählung erfolgte nach 24, 48, 72 bzw. 96 Stunden jeweils dreimal, so dass jeweils ein Mittelwert berechnet werden konnte.

## 4.3 Durchflusszytometrische Analysen

### 4.3.1 Funktionsweise des Durchflusszytometers (FACS Gerät)

Die Durchflusszytometrie ist ein geeignetes Hilfsmittel zur Charakterisierung von Zellen (Abb. 6). Die Zellen werden dabei durch einen Flüssigkeitsstrom in die Messküvette eingeführt und stark beschleunigt. Anschließend fließen sie einzeln durch eine dünne Messkammer, welche von einem Laser bestrahlt wird. Durch den Laserlichtstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm werden die Zellen angeregt und das Licht des Lasers durch die Zellen gestreut. Die Streuung des Lichts wird durch die Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie die intrazellulären Bestandteile beeinflusst. Ein großer Anteil des Lichts wird in Vorwärtsrichtung gestreut (forward light scatter, FSC), wodurch die Zellgröße erfasst wird. Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht wird Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) genannt und stellt ein Maß für die Granularität dar.

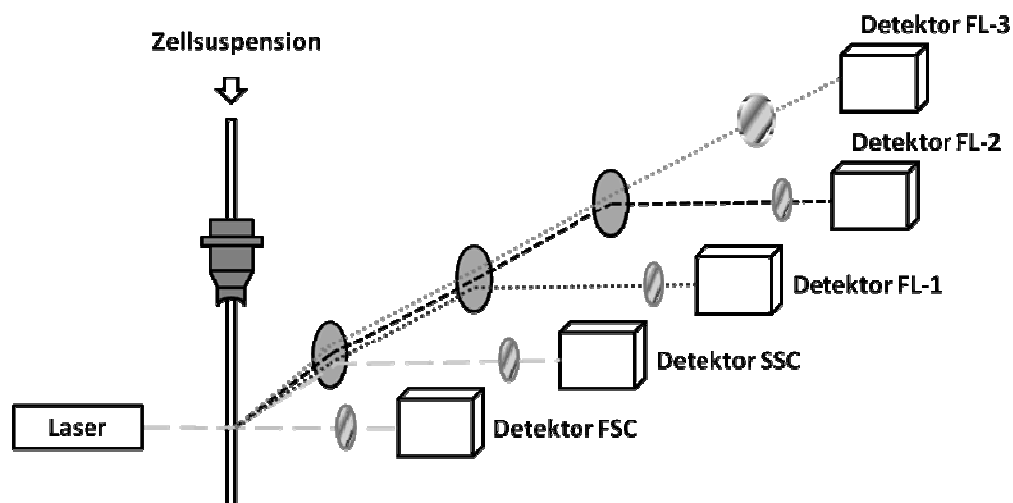


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des Aufbaus eines Durchflusszytometers.

### 4.3.2 Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid-Färbung

Der Zellzyklus unterteilt sich in eine Mitosephase und eine Interphase, die ihrerseits wiederum in G1-, S- und G2-Phasen unterteilt wird. In der G1-Phase befindet sich ein wichtiger Kontrollpunkt des Zyklus (Restriktionspunkt), an dem entschieden wird, ob die Zelle

den Zyklus ein weiteres Mal durchläuft oder sich in eine Gewebezelle differenziert (G0-Phase). In der sogenannten S-Phase kommt es zur Replikation der DNA, wobei Fehler auftreten können, welche in der darauffolgenden G2-Phase durch bestimmte Proteine erkannt und korrigiert werden, sodass in der Mitosephase eine Verteilung der verdoppelten DNA auf zwei Tochterzellen möglich ist.

Zur Durchführung der Zellzyklusanalysen wurden die Zellen zunächst gezählt, und die Zelldichte auf  $2 \times 10^5$  pro FACS-Röhrchen eingestellt. Anschließend wurden die Ansätze zweimal mit kaltem PBS gewaschen, auf Eis mit 200  $\mu$ l Lysis-Puffer für die PI-Färbung versetzt und fünf Minuten unter Lichtausschluss lysiert.

Aufgrund des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Propidiumiodid ist es möglich die Fluoreszenz der Zellen zu messen. Dazu wurden die Zellen sofort nach der Lyse mittels eines Durchflußzytometers analysiert.

Es wurden mindestens  $1 \times 10^4$  Zellen gemessen und die Ergebnisse mit Hilfe des ModFit LTTM-Programms ausgewertet. Hierbei wurde eine Histogramm-Darstellung gewählt, bei der auf der X-Achse die Fluoreszenz-Intensität des Kanals FL-2 und auf der Y-Achse die Anzahl der detektierten Ergebnisse aufgetragen wurde. Der erste Peak stellt die Zellen der G0/G1-Phase dar, der zweite Peak die Zellen der G2/M-Phase und der Intermediär-Bereich die Zellen in der S-Phase. Zellen, die DNA-Fragmentationen aufweisen und daher eine Fluoreszenz im Sub-G1-Bereich zeigten, representierten die sich in der Apoptose befindlichen Zellen.

### ***4.3.3 FACS-Analyse der Apoptose mit Annexin V-PE- und 7-AAD-Färbung***

Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen in einer Kultur wurde das „Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I“ nach Herstellerangaben verwendet.

Mittels Doppelfärbung konnte zwischen vitalen (Annexin V-PE negativ, 7-AAD negativ), frühapoptotischen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD negativ) und spätapoptotischen Zellen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD positiv) unterschieden werden. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden mit einem Durchflußzytometer analysiert.

Je Färbung wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml mit kaltem PBS zweimal gewaschen, für fünf Minuten abzentrifugiert, in einen Annexin V-Bindepuffer in einer Konzentration von

$1 \times 10^5$  Zellen/ml aufgenommen und mit Annexin V-FITC und 5  $\mu$ L 7-AAD versetzt. Nach dem Durchmischen des Färbeansatzes wurde diese 15 Minuten bei Raumtemperatur (25°C) im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 400  $\mu$ l vom Annexin V-Bindepuffer zu jeder Probe hinzugefügt und in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Detektion des an apoptotische Zellen gebundenen Annexins V-FITC erfolgte im Fluoreszenzkanal FL-2, für 7-AAD im Fluoreszenzkanal FL-3.

Am Ende errechnete sich die Zunahme der Apoptoserate durch die Applikation der Zytostatika im Vergleich zur Kontrolle nach folgender Formel:

$$\mathbf{[Zunahme\ der\ Apoptoserate = Apoptoserate\ Probe - Apoptoserate\ Kontrolle]}$$

Die Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe von WinMDI®.

#### 4.4 Berechnung der Fraction of Product

Um potentiell synergistische, additive sowie antagonistische Effekte zweier in Kombination verabreichter Medikamente zu ermitteln, wurden mittels der Formel nach Webb die Berechnung der Fraction of Product durchgeführt. Hierzu wurden  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml mit den zu untersuchenden Medikamenten in einer festgelegten Konzentration als Monotherapie und in Kombination mit 100 nM RAD001 bzw. mit 0,1  $\mu$ M Forodesin + 0,01  $\mu$ M dGuo exponiert. Die relative Zellzahlveränderung der behandelten Proben wurde mit dem jeweiligen Kontrollwert der unbehandelten Zellen verglichen und in Prozent angegeben (=fraction affected, FA), wobei die unbehandelte Kontrolle immer 100% entsprach. Die Ergebnisse wurden in folgender Formel nach Webb verrechnet (Webb, 1963):

$$\frac{(FA\ Substanz\ X) \times (FA\ Substanz\ Y) - (FA\ Kombination\ Substanz\ (X+Y))}{100\%}$$

Resultate, die nach der Kalkulation größer 0,1 waren, wurden als synergistisch, jene, die kleiner -0,1 waren als antagonistisch und Werte zwischen diesen Grenzwerten als additiv bewertet.

## **4.5 Statistische Auswertungen**

Die Daten wurden in Form von Microsoft Excel-Tabellen (Microsoft® Office Excel 2007 SP2; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) ausgewertet und erfasst. Quantitative Parameter wurden durch den Mittelwert und/oder Median und ggf. die Standardabweichung beschrieben.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Proliferationshemmung durch den mTOR-Inhibitor RAD001

Die im Screening-Verfahren eingesetzten Viabilitäts-Assays sollten potentielle Effekte der getesteten Substanzen auf die Zellen nachweisen.

Im Vordergrund der Arbeit stand die Bestimmung der Wirkung von RAD001 in Abhängigkeit von der applizierten Konzentration, die von einer Konzentration von 0,2 nM schrittweise bis zu 20 µM für RAD001 erhöht wurde.

Hierzu wurden die MCL-Zelllinien (Granta 519, Z 138, HBL-2, Jeko-1, Rec-1 und NCEB-1) sowie eine Kontrollzelllinie Jurkat (Ausgangszelldichte von  $0,5 \times 10^6$ /ml) mit RAD001 als Monosubstanz inkubiert und anschließend die Zellproliferation und Zellviabilität in drei unabhängigen Ansätzen nach 24-, 48-, 72- und 96-stündiger Exposition mittels Trypanblau-Ausschluss-Test bestimmt. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zelllinien, um eine unspezifische Wachstumshemmung von DMSO auszuschließen. RAD001 wurde dabei laut Herstellerangaben in DMSO aufgelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Es zeigte sich eine dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung in allen Zelllinien. Der mTOR-Inhibitor zeigte in allen Zelllinien schon bei einer Konzentration von 20 µM nach 24 Stunden eine Wirkung bis zur fast völligen Proliferationshemmung. Die Wirkung der RAD001-Konzentrationen von 200 nM, 20 nM, 2 nM und 0,2 nM auf die evaluierten Zelllinien war dagegen nach einer Kulturdauer von 24 Stunden noch nicht nachweisbar. Die größten Effekte wurden bei einer Kulturdauer von 48 und 72 Stunden beobachtet. Aus diesem Grund wurde die Wirkung von RAD001 nach 48 und 72 Stunden mit 0,2-2000 nM RAD001 in weiteren Versuchsreihen getestet (Abb. 7). Nach einer Kulturdauer von 96 Stunden (der längsten durchgeführten Inkubationszeit) scheint die Wirkung des mTOR-Inhibitors wieder abzunehmen. Dieser Effekt wurde als Abbau des mTOR-Inhibitors RAD001 nach 96 Stunden Inkubationsdauer interpretiert.

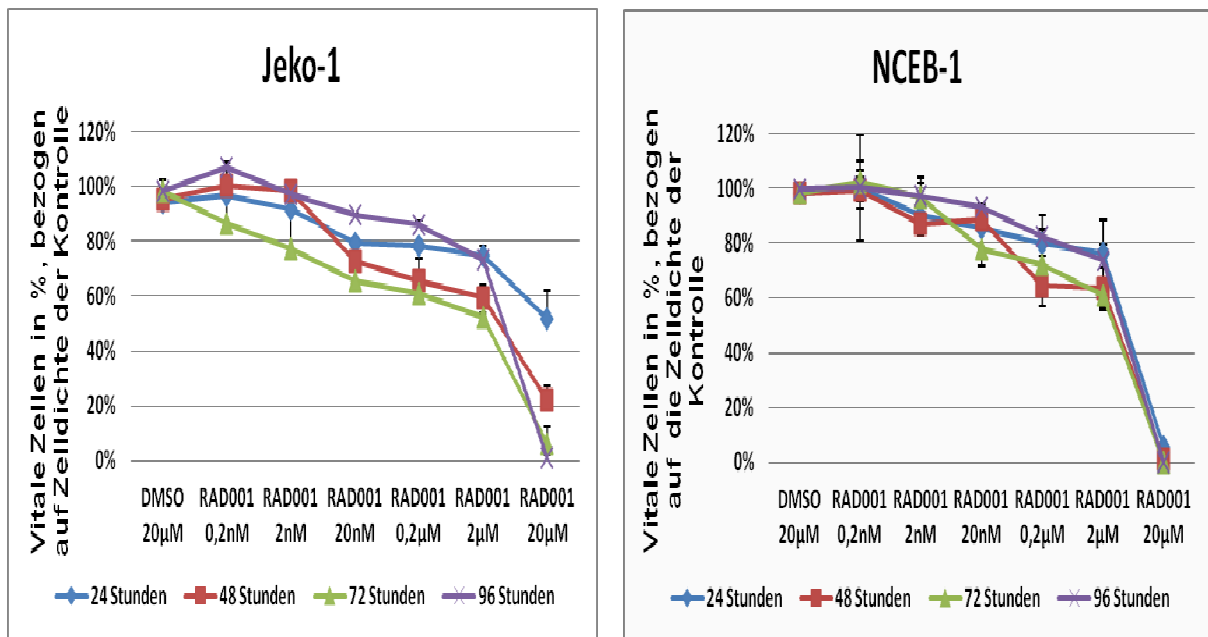


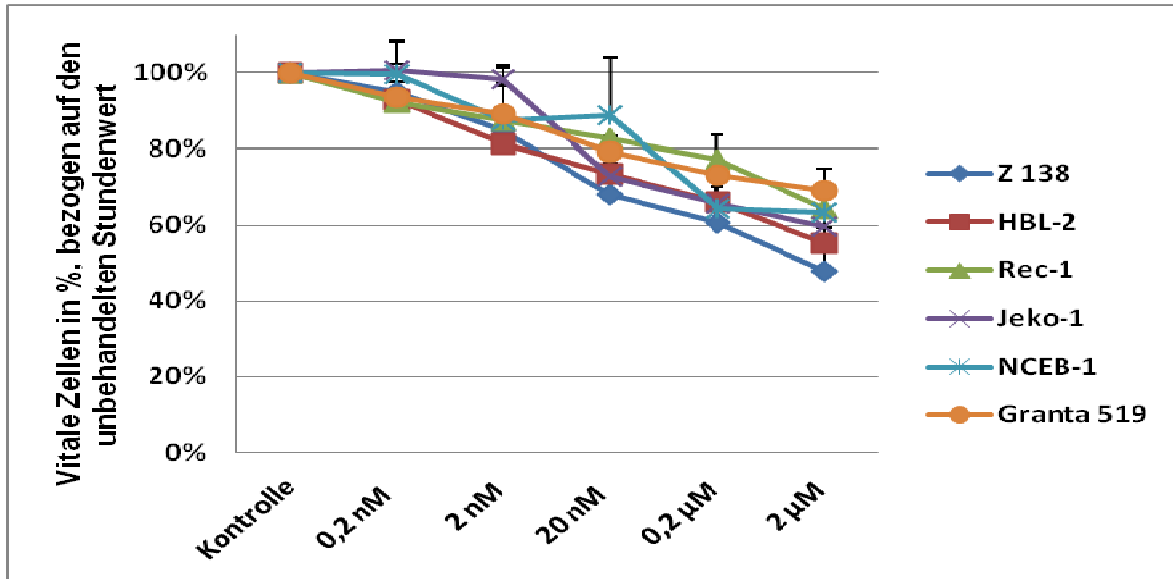
Abbildung 7: Dosis- und zeitabhängige proliferationshemmende Wirkung von 20 µM-0,2 nM R (RAD001) auf die Zelllinien Jeko-1 und NCEB-1.

Die Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor war bei einer Konzentration von 20 µM für alle Zelllinien letal. Nach der Behandlung mit RAD001 in einer Konzentration von 2 µM war die Proliferationshemmung innerhalb der MCL-Zelllinien annähernd vergleichbar. So zeigte die Zelllinie Z 138 nach 48 Stunden Behandlungsdauer eine vitale Zellzahl von 48% des Ausgangswertes, Granta 519 eine von 69%. Am empfindlichsten reagierten die Zelllinien Granta 519 (45%) und Jeko-1 (52%) auf den mTOR-Inhibitor nach 72 Stunden.

Da die einzelnen Zelllinien unterschiedliche Zellverdopplungszeiten zeigen, ist der direkte Vergleich der Wirksamkeit der Substanz zwischen den Zelllinien nur eingeschränkt möglich. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden daher die gemessenen Zellzahlen zusätzlich auf den jeweiligen Kontrollwert bei 48 und 72 Stunden bezogen (Abb. 8 A und B).



**A**



**B**

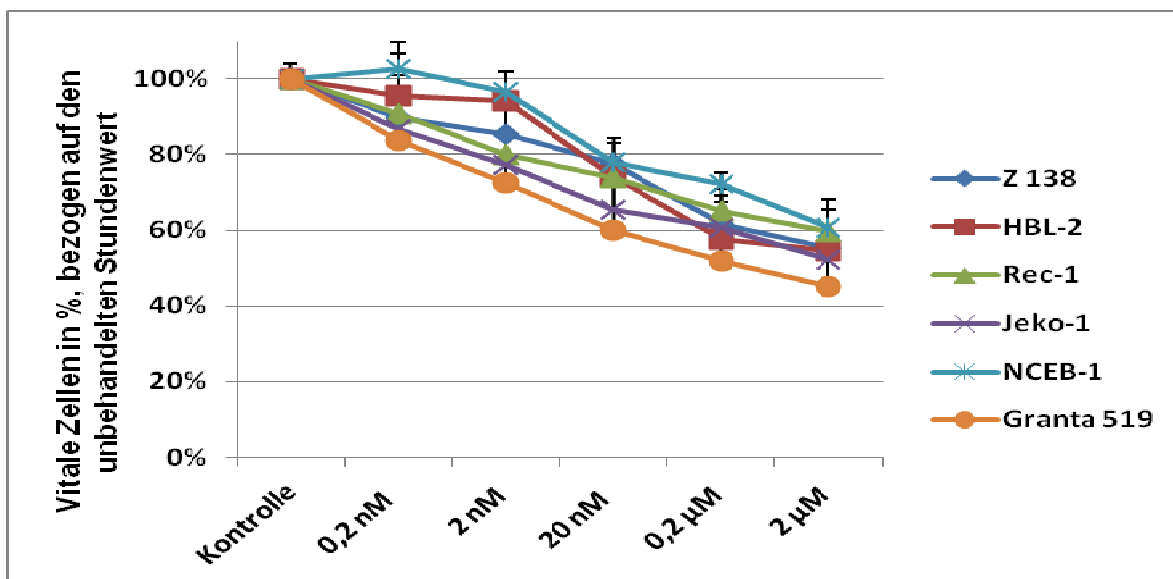


Abbildung 8: **A** und **B** zeigen die Zelldichte nach der Exposition von RAD001 (A: nach 48 Stunden und B: nach 72 Stunden). Die Werte wurden auf den zeitgleichen Kontrollwert der unbehandelten Zelllinie bezogen, um Verzerrungen durch unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten zu vermeiden. Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Aus den obigen Darstellungen wird deutlich, dass alle MCL-Zelllinien in diesen Proliferationsexperimenten auf den mTOR-Inhibitor empfindlich sind.

## 5.2 Induktion eines Zellzyklusarrests von MCL-Zelllinien durch RAD001

Die Analysen wurden nach 48 und 72 Stunden durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$ /ml angesetzt, mit dem Inhibitor inkubiert und anschließend im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle analysiert.

In allen MCL-Zelllinien veränderte sich nach Gabe von  $0,1 \mu\text{M}$  RAD001 das Zellzyklusprofil. Nach der RAD001-Exposition zeigte sich in allen MCL-Zelllinien eine Zunahme des Anteils der Zellen der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- und eine Abnahme des prozentualen Anteils der Zellen der S-Phase.

In Abbildung 9 werden repräsentative Histogramme für Jeko-1-Zellen nach der Behandlung mit  $100 \text{ nM}$  RAD001 dargestellt. Der erste Peak stellt die Zellen der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase, der zweite Peak die Zellen der G<sub>2</sub>/M-Phase dar. Die Zellen der S-Phase liegen im Intermediärbereich. Deutlich erkennbar sind die Veränderungen im Zellzyklusprofil nach 48 Stunden, mit einem Anstieg der Zellen der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase sowie einer Abnahme des prozentualen Anteils der Zellen der S-Phase.

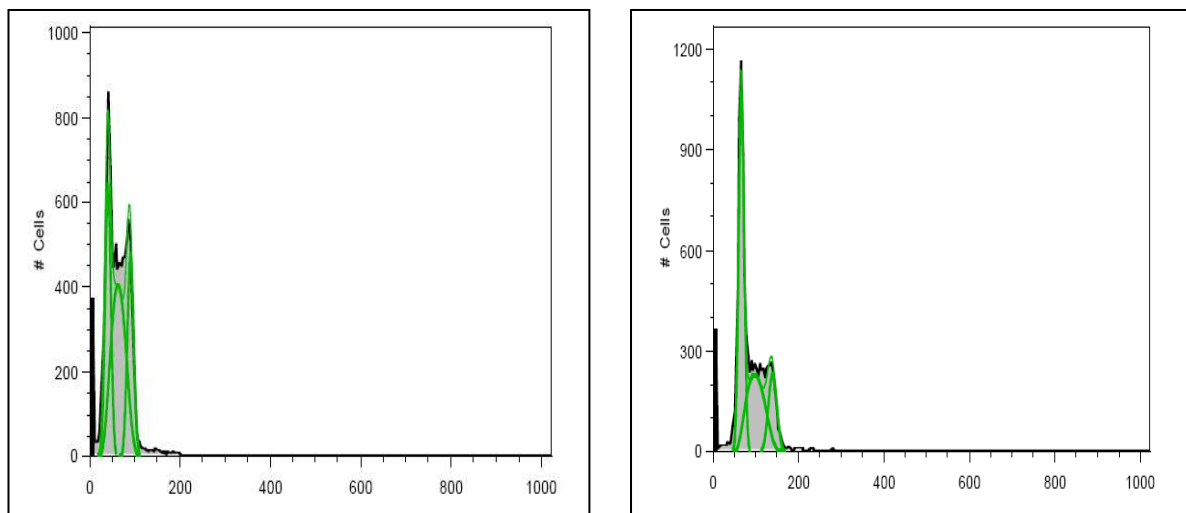


Abbildung 9: Veränderungen der Zellzyklusphasen der Zelllinie Jeko-1 in Relation zu der jeweiligen unbehandelten Kontrolle (links) nach 48 Stunden Behandlung mit  $100 \text{ nM}$  RAD001 (rechts).

(Dean/Jett/Fox Modell).

Die stärksten Verschiebungen im Zellzyklus zeigten NCEB-1, Jeko-1 und Z 138. So wies zum Beispiel die Zelllinie Jeko-1 einen Anstieg der Zellen der G<sub>1</sub>-Phase um 10% im Vergleich zur Kontrolle auf. Bei NCEB-1 war der G<sub>1</sub>-Anteil durch einen um 43% stark

erhöhten G1-Anteil nach 48 und um 24% erhöhten G1-Anteil nach 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle bemerkbar. Bei der Zelllinie NCEB-1 nahm die S-Phase nach 48 Stunden um 14% und nach 72 Stunden um 15% ab. Granta 519 zeigte keine relevanten Unterschiede in der S-Phase.

Eine vermehrte sub-G1-Fraktion als Maß für eine gesteigerte Apoptoserate konnte bei den untersuchten Zelllinien nicht beobachtet werden.

Um zu klären, ob der S-Arrest ein spezifisches Ereignis in MCL ist, wurden auch die Kontrollzelllinie Jurkat mit RAD001 behandelt und anschließend mittels PI-Färbung analysiert. Auch hier bestätigte sich die bereits bei den MCL festgestellte Zunahme der Zellen in der G0/G1-Phase mit 16% und Abnahme der S-Phase um 4% nach 72 Stunden.

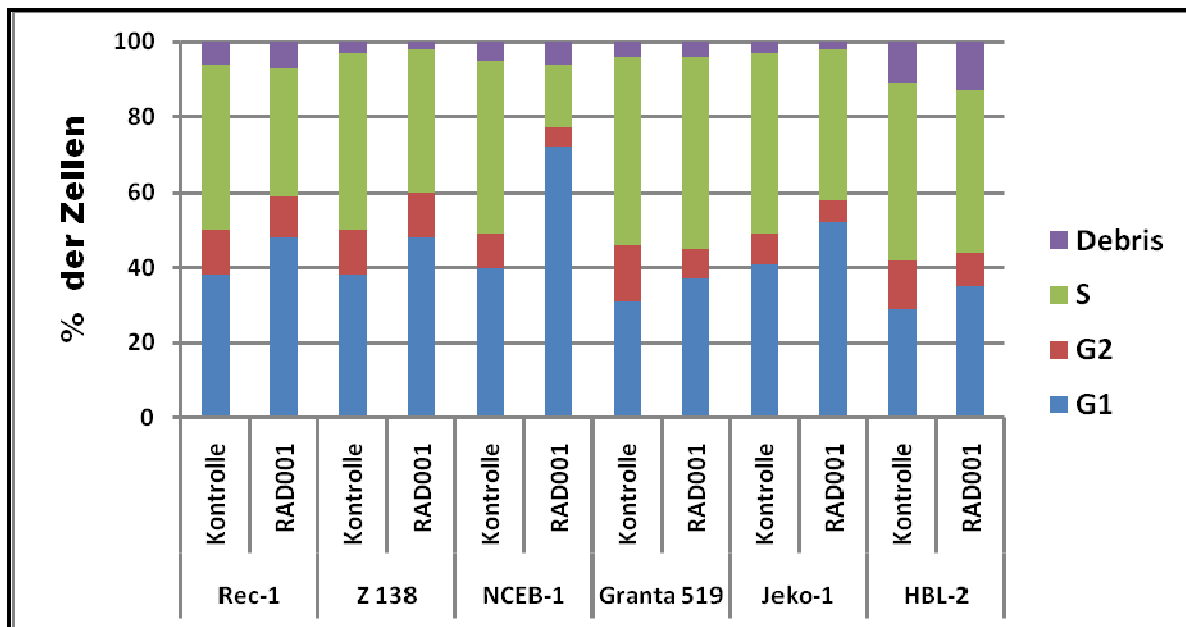
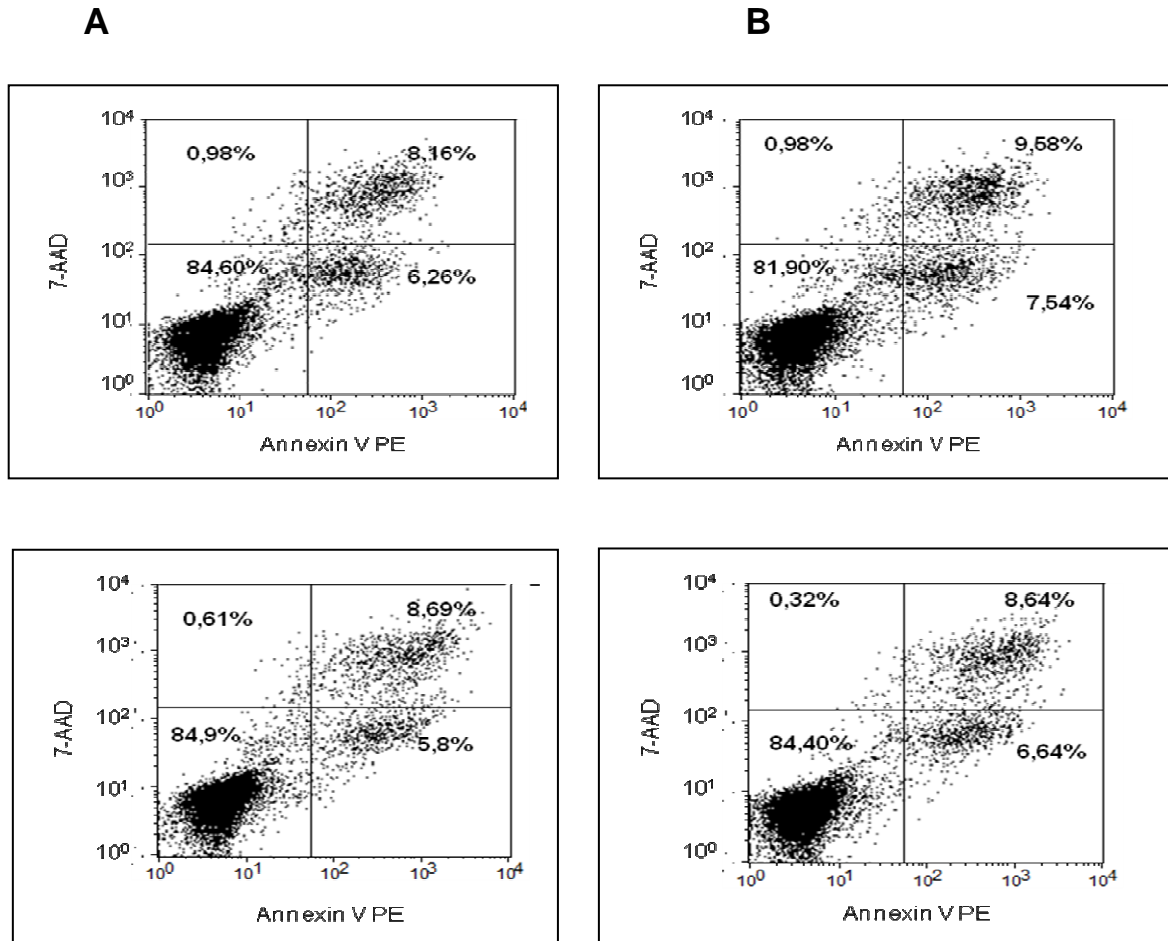


Abbildung 10: Zellzyklusanalysen durch PI-Färbung. Analyse des Zellzyklus in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien nach der Behandlung mit 100 nM RAD001 nach 48 Stunden. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

### 5.3 Apoptoseverhalten von MCL- und T-ALL Zelllinien nach der Behandlung mit RAD001

Zunächst wurden fünf MCL-Zelllinien (Granta 519, Z 138, HBL-2, Jeko-1 und Rec-1) daraufhin untersucht, ob durch die Behandlung mit RAD001 eine Apoptose induziert wer-

den konnte. Dazu wurden die Zellen, ebenso wie die Kontrollzelllinie Jurkat, im Zeitraum von 48 bis 96 Stunden vor der durchflußzytometrischen Analyse mit der festgelegten Konzentration von 100 nM RAD001 inkubiert.



**Abbildung 11:** Zeitlicher Verlauf der Apoptoseinduktion durch RAD001. Die Abbildungen zeigen einen repräsentativen Densityplot der Zelllinie Jeko-1.

**A:** Kontrolle nach 48 Stunden, **B:** Jeko-1 nach der Behandlung mit RAD001 nach 48 Stunden, **C:** Kontrolle nach 72 Stunden, **D:** Jeko-1 nach der Behandlung mit RAD001 nach 72 Stunden .

Anhand der Doppelfärbung mit Annexin V-PE und 7-AAD konnte in den Versuchen zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen unterschieden (Abb. 11) werden. Durch die Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung konnte auch der zeitliche Verlauf bestimmt werden.

Nach der Behandlung mit RAD001 zwischen 48 und 96 Stunden betrug der Anteil der vitalen MCL-Zelllinien im Vergleich zu der Anzahl der unbehandelten vitalen Zellen zwischen 98,18% und 100% (Grafik nicht dargestellt).

Hierbei bestätigt sich auch im direkten Apoptosetest der fehlende Nachweis der sub-G1-Phase in der Zellzyklusanalyse.

Auch bei der T-ALL-Zelllinie Jurkat zeigte der mTOR-Inhibitor RAD001 nach 48 Stunden keine wesentliche Apoptoseinduktion.

### **5.4 Kombination von RAD001 mit konventioneller Chemotherapie und molekularen Ansätzen**

Die Standardtherapie des MCL besteht derzeit aus einer Kombination mit Zytostatika und dem anti-CD20-Antikörper Rituximab, wie sie z.B. in den Schemata R-CHOP oder R-FCM zur Anwendung kommt. Durch den Einsatz des mTOR-Inhibitors RAD001 allein oder in Kombination könnte das therapeutische Armentarium des MCL ergänzt werden. Neben der Untersuchung des in Kapitel 5.1, 5.2 und 5.3 behandelten Einzeleffekts von RAD001 auf die MCL-Zelllinien galt das zweite Hauptinteresse der Untersuchung der Kombination von RAD001 mit konventionellen Chemotherapeutika, dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib und dem PKC $\beta$ -Inhibitor Enzastaurin sowie die Kombinationen von dem mTOR-Inhibitor mit dem PNP-Inhibitor Forodesin in Kombination mit dGuo. Eine detaillierte Auflistung der beobachteten Kombinations-Effekte des mTOR-Inhibitors RAD001 liefern die Tabellen 2 A-E.

### 5.4.1 Kombination von RAD001 und Cytarabin

Die Analyse der Kombination von RAD001 und Cytarabin zeigen eine additive Wirkung bei den Zelllinien Z 138, Rec-1, Granta 519, HBL-2, bei der Zelllinie Jeko-1 sowie bei der Zelllinie Jurkat. Dieselbe additive Wirkung findet sich auch bei der Zelllinie Jurkat nach 48 und 72 Stunden wieder.

Zelllinie	Cytarabin	RAD001+Cytarabin
	72 Stunden	
Jeko-1	29%(±5)	15%(±6) (+)
Z 138	3%(±2)	6%(±1) (+)
Rec-1	15%(±4)	11%(±4) (+)
Granta 519	11%(±2)	13%(±3) (+)
HBL-2	12%(±3)	17%(±4) (+)
Jurkat	9%(±3)	9%(±5) (+)

Tabelle 2 A

Tabelle 2 A-E: Additive, synergistische sowie antagonistische Effekte in MCL-Zelllinien und Jurkat nach der mTOR-Inhibitor-Behandlung in Kombination mit Zytostatika, einem Proteasom-Inhibitor und einem PKCβ-Inhibitor. Dargestellt ist der prozentuale Anteil vitaler Zellen bezogen auf die unbehandelte Zelllinie. Mittelwert±Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten und synergistische Werte sind fett gedruckt. Einteilung Wirkstärke: additive Wirkung=+, Synergismus=\*, Antagonismus=-.

### 5.4.2 Kombination von RAD001 und Bendamustin

Insgesamt zeigten alle untersuchten Zelllinien nach 72 Stunden additive Wirkungseffekte, mit Ausnahme von Granta 519.

Zelllinie	Bendamustin	RAD001+Bendamustin
	72 Stunden	
<i>Jeko-1</i>	22%(±1)	31%(±4) (+)
<i>Z 138</i>	12%(±9)	17%(±8) (+)
<i>Rec-1</i>	30%(±4)	29%(±3) (+)
<i>Granta 519</i>	66%(±11)	65%(±7) (-)
<i>HBL-2</i>	41%(±3)	34%(±4) (+)
<i>Jurkat</i>	53%(±8)	52%(±7) (+)

Tabelle 2 B

### 5.4.3 Kombination von RAD001 und Fludarabin

Die Kombination von RAD001 und Fludarabin zeigte bei den untersuchten MCL-Zelllinien eine heterogene und bei der T-ALL-Zelllinie eine additive Wirkung.

Bei der Zelllinie *Jeko-1* war nach der Behandlungszeit von 72 Stunden ein Synergismus und bei der Kombination von *HBL-2* und *Jurkat* eine additive Wirkung zu beobachten. Bei den MCL-Zelllinien *Granta 519* und *Z 138* war dagegen eine antagonistische Interaktion festzustellen.

Zelllinie	Fludarabin	RAD001+Fludarabin
	72 Stunden	
<i>Jeko-1</i>	34%(±10)	19%(±4) (*)
<i>Z 138</i>	39%(±3)	46%(±8) (-)
<i>Rec-1</i>	55%(±13)	36%(±13) (+)
<i>Granta 519</i>	59%(±9)	55%(±8) (-)
<i>HBL-2</i>	50%(±28)	42%(±6) (+)
<i>Jurkat</i>	46%(±7)	44%(±9) (+)

Tabelle 2 C

#### 5.4.4 Kombination von RAD001 und Bortezomib

Die Kombination von RAD001 und Bortezomib führte bei den Zelllinien Jeko-1, Z 138 und Rec-1 durch die Koinkubation zu antagonistischen Effekten.

Zelllinie	Bortezomib	RAD001+Bortezomib
	72 Stunden	
Jeko-1	63%(±9)	75%(±14) (-)
Z 138	67%(±19)	77%(±9) (-)
Rec-1	42%(±3)	46%(±18) (-)
Granta 519	31%(±6)	22%(±2) (+)
HBL-2	64%(±9)	45%(±17) (+)
Jurkat	62%(±9)	35%(±4) (+)

Tabelle 2 D

#### 5.4.5 Kombination von RAD001 und Enzastaurin

Die Zelllinien Jeko-1, Z 138, Rec-1 und Jurkat zeigten nach der Behandlung mit der Kombination von RAD001 und Enzastaurin sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden eine additive Wirkung, lediglich die Zelllinie Granta 519 zeigte eine synergistische Wirkung nach 72 Stunden Expositionszeit.

Zelllinie	Enzastaurin	RAD001+Enzastaurin
	72 Stunden	
Jeko-1	8%(±4)	4%(±1) (+)
Z 138	37%(±14)	36%(±5) (+)
Rec-1	39%(±7)	29%(±4) (+)
Granta 519	65%(±7)	34%(±6) (*)
HBL-2	54%(±6)	14%(±3) (+)
Jurkat	27%(±8)	15%(±5) (+)

Tabelle 2 E



## 5.5 Auswirkung auf den Zellzyklus und Apoptose durch RAD001 in Kombination mit Bendamustin, Bortezomib und Fludarabin

Der erste Teil der Analysen mit dem Trypanblau-Assay diente der Abschätzung, ob RAD001 in Kombination mit den anderen untersuchten Therapeutika einen zusätzlichen proliferationshemmenden Effekt hat. Synergistische, antagonistische sowie additive Wirkungen, die nach der Auswertung der Trypanblau-Assay-Daten festgestellt werden konnten, wurden dann in den Zellzyklus- und Apoptose-FACS-Analysen als Bestätigung dieser Beobachtungen noch einmal genauer untersucht.

### 5.5.1 Zellzyklusanalyse

Ein deutlicher Unterschied zur Bendamustin Monotherapie konnte in der Zellzyklusanalyse durch die Kombinationstherapie RAD001+Bendamustin bei der MCL-Zelllinie Rec-1 festgestellt werden. Diese Zelllinie wies eine Zunahme der G1-Phase um 27% und eine Abnahme der S-Phase um 11% im Vergleich zur Bendamustin Monotherapie auf.

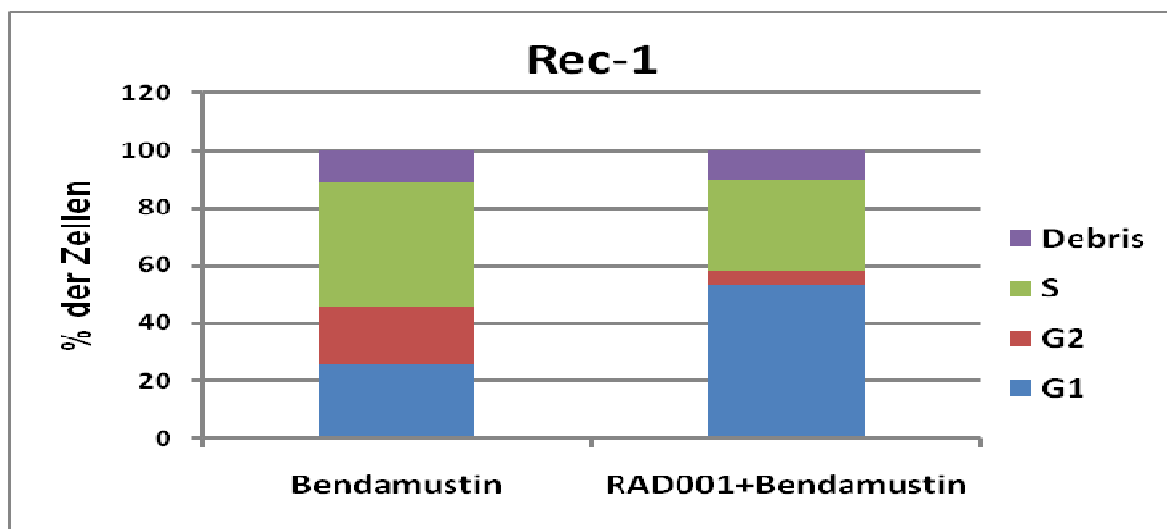


Abbildung 12: Auswirkung auf den Zellzyklus durch RAD001 in Kombination mit Bendamustin am Beispiel der MCL-Zelllinie Rec-1 nach 48 Stunden. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

Weniger empfindlich auf die Kombination reagierten die anderen MCL-Zelllinien. So zeigte zum Beispiel die Zelllinie Jeko-1 eine G1-Phase-Zunahme um 16% und eine Abnahme des prozentualen Anteils der Zellen der S-Phase um 4% nach 48 Stunden Behandlung.

Bei der Zelllinie Jurkat konnte die Kombinationstherapie RAD001+Bendamustin vor allem nach 72 Stunden Inkubationszeit eine G1-Phase-Zunahme um 15% und eine noch deutlichere S-Phase-Abnahme um 20% erzielt werden.

Die Kombination von RAD001 mit Bortezomib führte in der Zellzyklusanalyse im Vergleich zu der Bortezomib Monotherapie zu einer Zunahme der G1-Phase und der S-Phase-Abnahme. Die Zelllinie Rec-1 wies nach 72 Stunden Behandlungszeit mit RAD001+Bortezomib eine Zunahme der G1-Phase um ca. 20% und eine Abnahme der S-Phase um 17% im Vergleich zur Bortezomib Monotherapie auf. Die Zelllinie Jeko-1 zeigte eine G1-Phase-Zunahme um 14% im Vergleich zur Bortezomib Monotherapie.

Die Kontrollzelllinie Jurkat wies nach der Behandlung mit Bortezomib plus RAD001 eine G1-Phase-Zunahme um 15% und eine S1-Phase-Abnahme um 19% nach 72 Stunden Expositionszeit auf.

Die Kombination von Fludarabin und RAD001 zeichnete sich bei den Zellzyklusanalysen durch deutliche Veränderungen im Zellzyklusprofil der MCL-Zelllinien im Vergleich zur Fludarabin Monotherapie aus. Die Zelllinie Rec-1 zeigte nach 48 Stunden eine G1-Phase-Zunahme um 21% und eine S-Phase-Abnahme um 11% (Abb. 13). Bei der Zelllinie Jeko-1 führte die Behandlung mit der Kombination von Fludarabin und RAD001 nach 48 Stunden Expositionszeit zu einer G1-Phase-Zunahme um 11% und einer S-Phase-Abnahme um 23%. HBL-2 wies nach 72 Stunden Behandlungszeit im Vergleich zur Fludarabin Monotherapie eine G1-Phase-Zunahme um 18% und eine S-Phase-Abnahme um 11% auf.

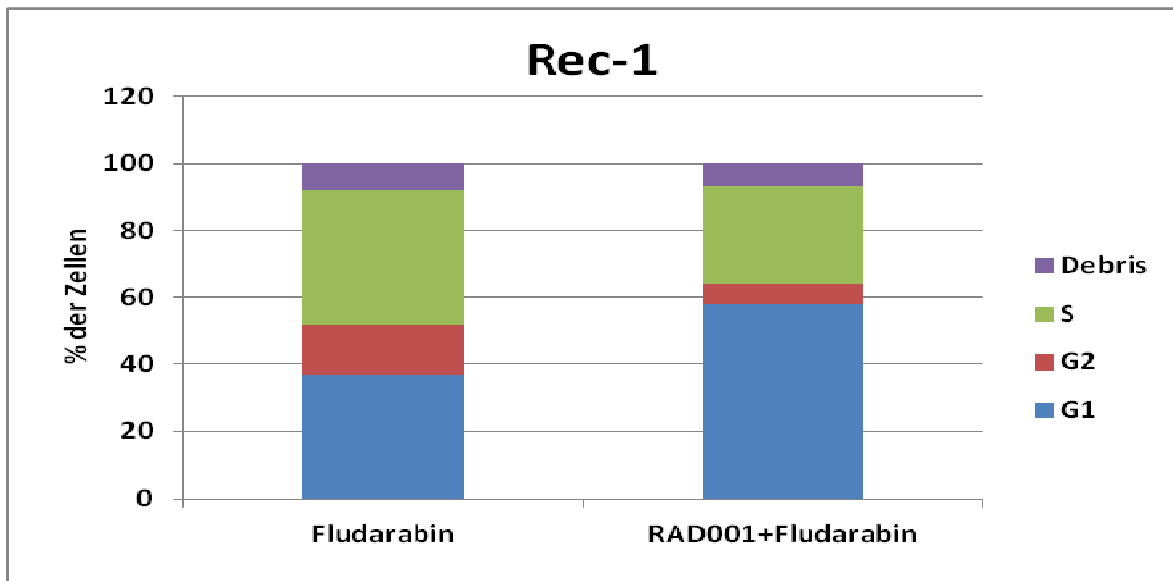


Abbildung 13: Auswirkung auf den Zellzyklus am Beispiel der MCL-Zelllinie Rec-1. Dargestellt ist der prozentuale Vergleich zwischen der Fludarabin Monotherapie im Vergleich zur Kombination mit RAD001 nach 48 Stunden. Angezeigt wird der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

Bei der Kombination von Fludarabin und RAD001 konnte bei der T-ALL-Zelllinie Jurkat eine Zunahme der G1-Phase um 20% im Vergleich zur Fludarabin Monotherapie erzielt werden.

### 5.5.2 Apoptoseanalyse

Um genauer zu überprüfen, ob die Kombinationen mit anderen Zytostatika eine vermehrte Apoptose induzieren würden, wurden diese in einem Apoptose-Assay genauer untersucht.

So wurden beispielsweise die Kombinationen, die im Trypanblau-Versuch eine vermehrte Proliferationshemmung zeigten, auf diese Weise getestet.

Durch die Zugabe von Bortezomib, Bendamustin und Fludarabin zum mTOR-Inhibitor konnte keine wesentliche Apoptoseinduktion erzielt werden.

	Bortezomib	RAD001+Bortezomib	Fludarabin	RAD001+Fludarabin	Bendamustin	R+Bendamustin
Jurkat	4,3 (±2,02)	5,01 (±2,04)	4,64 (±1,88)	5,67 (±2,3)	3,82 (±1,4)	5,02 (±2,3)
Jeko-1	4,18 (±0,64)	6,03 (±0,01)	9,73 (±0,4)	10,05 (±0,77)	4,88 (±4,84)	3,76 (±4,8)
HBL-2	4,72 (±0,67)	7,34 (±4,02)	19,04 (±5,4)	19,56 (±3,2)	18,52 (±19,06)	3,52 (±4,41)
Rec-1	8,67 (±9,03)	10,91 (±13)	16,18 (±0,66)	17,95 (±0,11)	24,24 (±10)	15,23 (±5,0)
Z 138	2,1 (±0,07)	2,34 (±0,09)	7,66 (±7,63)	4,98 (±3,4)	9,49 (±10,6)	17,55 (±2,78)

Tabelle 3: Die Tabelle zeigt die Apoptoseanalyse nach 48 Stunden. Dargestellt sind die Anteile der apoptotischen Zellen in Prozent für die Kombinationsexperimente aus RAD001 und Bortezomib, Fludarabin sowie Bendamustin. Angezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung in Klammern aus drei unabhängigen Experimenten.

## 5.6 Proliferationshemmung durch den PNP-Inhibitor Forodesin+dGuo

Die Erforschung der Wirkung von Forodesin auf die MCL-Zelllinien war ebenso Gegenstand dieser Arbeit. Dazu wurde die proliferationsinduzierende Konzentration von 0,1 µM-10 µM für Forodesin in Kombination mit dGuo (0,1-1 µM) untersucht.

Hierzu wurden die MCL-Zelllinien (Granta 519, Z 138, HBL-2, Jeko-1, Rec-1 und NCEB-1) sowie eine Kontrollzelllinie (Jurkat) mit Forodesin+dGuo als Monosubstanz inkubiert und anschließend die Proliferation und Viabilität nach 24, 48, 72 und 96-stündiger Exposition mittels Trypanblau-Ausschluss-Test bestimmt.

Nach 48- und 72-stündiger Auswertung der Trypanblau-Vitalitätsergebnisse zeigten die MCL-Zelllinien bei der Behandlung von Forodesin unter Beigabe von dGuo ein ähnliches Verhalten. Es ergab sich eine dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung in allen Zelllinien. Die stärkste Proliferationshemmung zeigte unter 10 µM Forodesin+1 µM dGuo die Zelllinie Granta 519 mit einer Zellzahl von 58% des Ausgangswertes nach 48 Stunden und 67% des Ausgangswertes nach 72 Stunden. Die Kontrollzelllinie Jurkat war mit einer Zellzahl von 23% des Ausgangswertes nach 48 Stunden und 39% nach 72 Stunden.

den (10  $\mu\text{M}$  Forodesin+1  $\mu\text{M}$  dGuo) bzw. 46% und 54% (1  $\mu\text{M}$  Forodesin+0,1  $\mu\text{M}$ ) deutlich empfindlicher (Abb. 14).

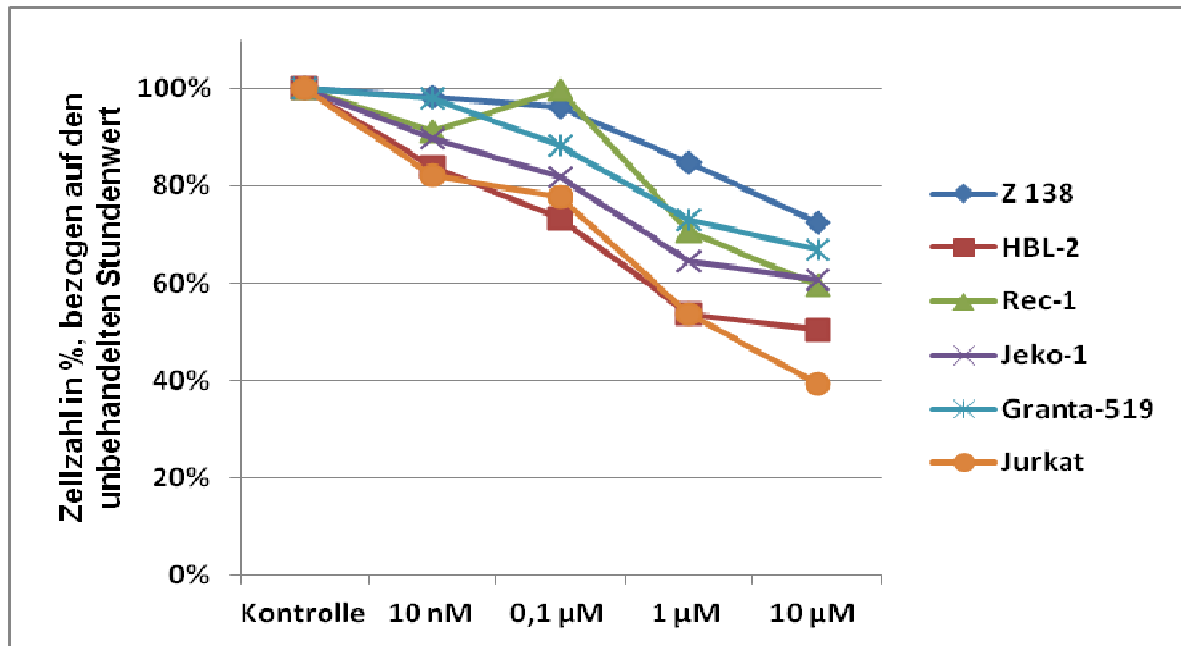


Abbildung 14: Zellzahl nach der Exposition von Forodesin (0,01-10  $\mu\text{M}$ )+dGuo (0,001-1  $\mu\text{M}$ ) bezogen auf die Zellzahl der unbehandelten Zelllinie. Die Mittelwerte stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

Kein deutlicher Unterschied konnte zwischen der höchsten ausgewählten Konzentration und 1  $\mu\text{M}$  Forodesin+0,1  $\mu\text{M}$  bei denselben Bedingungen festgestellt werden. Somit wurde letztere Konzentration für die Kombinationsversuche gewählt. Die Konzentrationen von 0,1-0,01  $\mu\text{M}$  Forodesin zeigten unter Beigabe von dGuo hingegen keine relevante Wirksamkeit im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle.

## 5.7 Auswirkung auf den Zellzyklus durch Forodesin+dGuo

Im Gegensatz zur Behandlung mit RAD001 zeigte Forodesin keine wesentlichen Veränderungen im Zellzyklus der MCL-Zelllinien.

Nur geringen Einfluss auf die MCL-Zelllinien hatte die Beigabe von 1  $\mu\text{M}$  sowie von 10  $\mu\text{M}$  Forodesin im Beisein von 0,1  $\mu\text{M}$  bzw. von 1  $\mu\text{M}$  dGuo.

So kam es nach 48 Stunden Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Forodesin im Beisein von 0,1  $\mu\text{M}$  dGuo bei der empfindlichen MCL-Zelllinie Jeko-1 nur zu einer geringen Zunahme der G1-Phase von 41% auf 43% und zu einer Abnahme der S-Phase von 36% auf 33,5%.

Ein ganz anderes Bild ergab sich bei der T-Zelllinie Jurkat. Sie zeigte einen deutlichen Anstieg der G1-Phase von 32% auf 48% (1  $\mu$ M Forodesin) bzw. auf 85% (10  $\mu$ M Forodesin) und einen Abfall der S-Phase von 53% auf 34% (1  $\mu$ M Forodesin) bzw. auf 9% (10  $\mu$ M) sowie eine Zunahme der sub-G1-Phase von 2% auf 9% (10  $\mu$ M Forodesin). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen aus dem Trypanblau-Versuch und konnten somit bestätigt werden.

### **5.8 Apoptoseverhalten von MCL- und T-ALL-Zelllinien nach der Behandlung mit Forodesin+dGuo**

Die Wirkung von Forodesin auf das Apoptoseverhalten von MCL- und T-ALL-Zelllinien wurde auch unter der Beigabe von dGuo überprüft. Zunächst wurden alle fünf MCL-Zelllinien (Granta 519, Z 138, HBL-2, Jeko-1 und Rec-1) daraufhin untersucht, ob eine Apoptose durch die Behandlung von Forodesin+Guo induziert werden konnte. Dazu wurden die Zellen, ebenso wie die Kontrollzelllinie Jurkat, 48 und 72 Stunden vor der durchflußzytometrischen Analyse mit einer festgelegten Konzentration von 1  $\mu$ M Forodesin+0,1  $\mu$ M Guo inkubiert.

Die MCL-Zelllinie Rec-1 zeigte nach der Behandlung mit Forodesin+dGuo über 48 bzw. 96 Stunden Inkubationszeit einen Anteil an nicht apoptotischen Zellen von 98% ( $\pm 2\%$ ). Für die Zelllinie Jeko-1 ergab sich nach 72 Stunden Behandlung ein Anteil an nicht apoptotischen Zellen von 83% ( $\pm 1,5\%$ ). Damit unterschied sich dieser Wert kaum von der unbehandelten Kontrolle (85% ( $\pm 0,2\%$ )) (Abb. 15). Ebenso war nach der Behandlung mit Forodesin+dGuo im direkten Apoptosetest keine sub-G1-Phase in der Zellzyklusanalyse nachweisbar (Grafik nicht dargestellt).

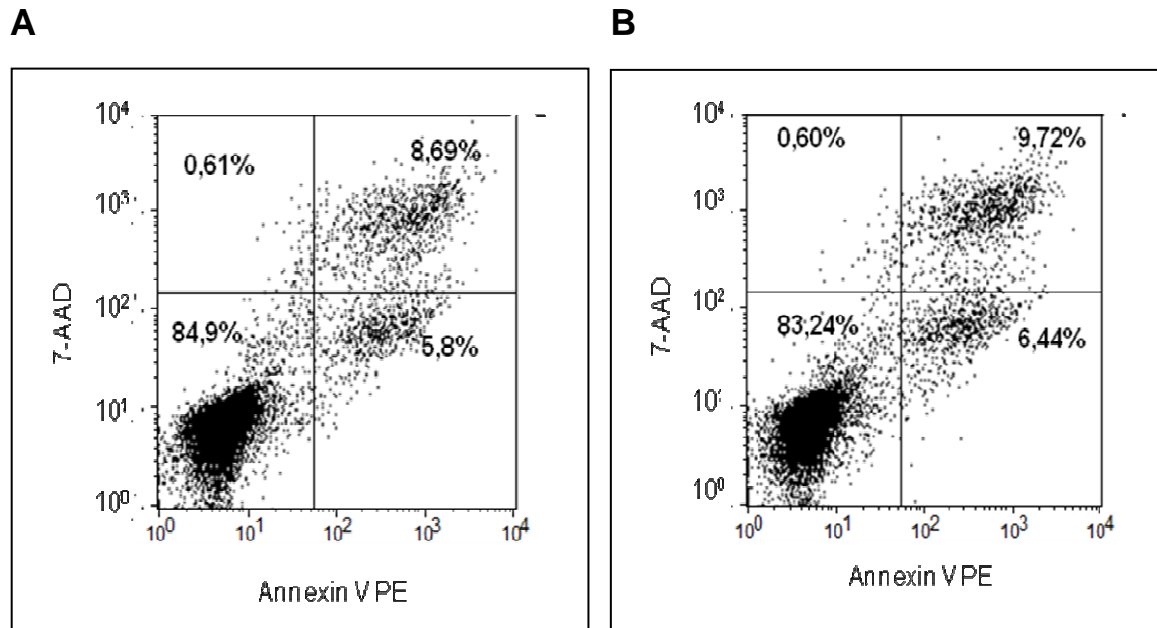


Abbildung 15: Repräsentativer Densityplot der Zelllinie Jeko-1. Zeitlicher Verlauf der Apoptoseinduktion durch Forodesin+dGuo nach 72 Stunden

**A:** Unbehandelte Kontrolle, **B:** Jeko-1 nach der Behandlung mit 1  $\mu$ M Forodesin+0,1  $\mu$ M dGuo.

Interessanterweise zeigte auch die Zelllinie Jurkat nach der Behandlung mit Forodesin+dGuo innerhalb von 72 Stunden keine vermehrte Apoptose. So betrug der Anteil der vitalen Jurkat-Zellen nach der Behandlung mit Forodesin+dGuo über 48 bzw. 72 Stunden 100% ( $\pm 1\%$  bzw.  $\pm 1,7\%$ ).

## 5.9 Kombination von Forodesin+dGuo mit konventioneller Chemotherapie und molekularen Ansätzen

Neben der Untersuchung des in den Kapiteln 5.6-5.8 behandelten Einzeleffekts von Forodesin+dGuo auf die MCL-Zelllinien galt das zweite Hauptinteresse der Untersuchung dem Nachweis eines Synergismus zwischen dem PNP-Inhibitor Forodesin in Kombination mit dGuo und den zur Anwendung gekommenen konventionellen Chemotherapeutika, dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib und dem PKC $\beta$ -Inhibitor Enzastaurin.

Eine detaillierte Auflistung der beobachteten synergistischen Effekte des PNP-Inhibitors Forodesin in Kombination mit dGuo liefern die Tabellen 4 A-F.

### 5.9.1 Kombination von Forodesin+dGuo und Cytarabin

Der Purin-Nukleosid-Phosphorylase-Inhibitor Forodesin mit dGuo zeigte in Kombination mit Cytarabin nach 72 Stunden vorwiegend eine additive Wirkung. Die Zelllinien Jeko-1, Z138 und HBL-2 wiesen nach 72 Stunden einen additiven Effekt auf, ebenso wie Granta 519 und die Kontrollzelllinie Jurkat nach 48 und 72 Stunden. Bei Rec-1 wurde dagegen nach 72 Stunden ein antagonistischer Effekt beobachtet.

Zelllinie	Cytarabin	Forodesin (dGuo)+Cytarabin
	72 Stunden	
Jeko-1	29%(±5)	21%(±4) (+)
Z 138	3%(±2)	34%(±6) (+)
Rec-1	15%(±4)	23%(±7) (-)
Granta 519	11%(±2)	10%(±2) (+)
HBL-2	12%(±3)	20%(±6) (+)
Jurkat	9%(±3)	12%(±5) (+)

Tabelle 4 A

Tabelle 4 A-F Additive, synergistische sowie antagonistische Effekte in den MCL-Zelllinien und Jurkat nach der Behandlung mit Forodesin+dGuo. Der PNP-Inhibitor Forodesin unter Beigabe von dGuo wurde jeweils mit anderen Zytostatika, einem Proteasom-Inhibitor und einem PKCβ-Inhibitor kombiniert. Dargestellt ist die prozentuale Zellzahl bezogen auf die Zellzahl der unbehandelten Kontrolle. Mittelwert±Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten und synergistische Werte sind fett gedruckt. additive Wirkung =+, Synergismus=\*, Antagonismus=-.

### 5.9.2 Kombination von Forodesin+dGuo und Bendamustin

Die Kombination von Forodesin+dGuo und Bendamustin zeigte bei vier von fünf MCL-Zelllinien nach 72 Stunden Expositionszeit und bei der T-ALL-Zelllinie Jurkat nach 48 Stunden eine additive Wirkung. Ein synergistischer Effekt war nach 48 Stunden lediglich



bei der Zelllinie Jeko-1 zu erkennen. Ein Antagonismus wiesen die MCL-Zelllinie Granta 519 und die Kontrollzelllinie Jurkat nach 72 Stunden auf.

Zelllinie	Bendamustin	Forodesin+(dGuo)+Bendamustin
	72 Stunden	
Jeko-1	22%(±1)	20%(±8) (+)
Z 138	12%(±9)	4%(±3) (+)
Rec-1	30%(±4)	29%(±3) (+)
Granta 519	66%(±11)	67%(±10) (-)
HBL-2	41%(±3)	39%(±12) (+)
Jurkat	53%(±8)	59%(±5) (-)

Tabelle 4 B

### 5.9.3 Kombination von Forodesin+dGuo und Fludarabin

Die Kombination von Forodesin und Fludarabin zeigte nach 72 Stunden Expositionszeit eine antagonistische Wirkung bei Granta 519, Z 138, HBL-2, Rec-1 und der T-ALL-Zelllinie Jurkat. Eine synergistische Wirkung ergab sich lediglich bei der Zelllinie Jeko-1 nach den beiden festgelegten Zeitpunkten. Bei den übrigen vier MCL-Zelllinien und der Kontrollzelllinie Jurkat war nach 72 Stunden Expositionszeit eine antagonistische Wirkung zu erkennen, mit Ausnahme von HBL-2, die zu diesem Zeitpunkt einen additiven Effekt aufwies.

Zelllinie	Fludarabin	Forodesin+(dGuo)+Fludarabin
	72 Stunden	
Jeko-1	34%(±10)	41%(±6) (*)
Z 138	39%(±3)	70%(±8) (-)
Rec-1	55%(±13)	60%(±12) (-)
Granta 519	59%(±9)	63%(±9) (-)
HBL-2	50%(±28)	52%(±7) (+)
Jurkat	46%(±7)	57%(±12) (-)

Tabelle 4 C

### 5.9.4 Kombination von Forodesin+dGuo und Bortezomib

Die Kombination von Forodesin+dGuo und Bortezomib zeigte eine antagonistische Wirkung bei den vier MCL-Zelllinien und bei der Zelllinie Jurkat.

Bei der Zelllinie Jeko-1 ergab sich dagegen eine additive Wirkung.

Zelllinie	Bortezomib	Forodesin+(dGuo)+Bortezomib
	72 Stunden	
Jeko-1	63%(±9)	85%(±11) (+)
Z 138	67%(±19)	84%(±5) (-)
Rec-1	42%(±3)	83%(±7) (-)
Granta 519	31%(±6)	47%(±3) (-)
HBL-2	64%(±9)	70%(±13) (-)
Jurkat	62%(±9)	54%(±5) (-)

Tabelle 4 D

### 5.9.5 Kombination von Forodesin+dGuo und Enzastaurin

Die Applikation des PKCβ-selektiven Inhibitors Enzastaurin in Kombination mit Forodesin+dGuo hatte bei der MCL-Zelllinie Granta 519 nach 72 Stunden und bei der Zelllinie HBL-2 sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden synergistische Effekte.

Zelllinie	Enzastaurin	Forodesin+(dGuo)+Enzastaurin
	72 Stunden	
Jeko-1	8%(±4)	5%(±2) (+)
Z 138	37%(±14)	4%(±11) (+)
Rec-1	39%(±7)	28%(±8) (+)
Granta 519	65%(±7)	33%(±9) (*)
HBL-2	54%(±6)	14%(±3) (*)
Jurkat	27%(±8)	14%(±6) (+)

Tabelle 4 E

Additive Wirkung wiesen nach 72 Stunden Behandlung die Zelllinien Jeko-1, Z 138 und Rec-1 auf. Bei der Kontrollzelllinie Jurkat ergab sich nach 48 und 72 Stunden Exposition eine additive Wirkung.

### 5.9.6 Kombination von Forodesin+dGuo und RAD001

Die Kombination von RAD001 und Forodesin in Gegenwart von dGuo zeigte eine antagonistische Wirkung bei zwei der fünf MCL-Zelllinien (Rec-1, Granta 519) nach 72 Stunden und bei einer MCL-Zelllinie (Z 138) nach 48 Stunden Expositionszeit. Synergistische Effekte wies die Zelllinie Jeko-1 zu den beiden untersuchten Zeitpunkten auf.

Zelllinie	Forodesin+dGuo	RAD001+Forodesin+dGuo
	72 Stunden	
Jeko-1	87%(±5)	67%(±8) (*)
Z 138	73%(±17)	71%(±0) (+)
Rec-1	68%(±15)	67%(±11) (-)
Granta 519	77%(±11)	88%(±2) (-)
HBL-2	92%(±6)	52%(±10) (*)
Jurkat	70%(±12)	52%(±5) (+)

Tabelle 4 F

## 6 Diskussion

Bis vor knapp 10 Jahren stützte sich die Tumorthherapie auf drei Säulen: Die Chirurgie, die Strahlentherapie und die zytostatische Chemotherapie. Eine definitive Heilung im Bereich der soliden Tumore versprach meist nur eine vollständige Entfernung des Tumors durch einen Chirurgen. Radiotherapeuten und Onkologen konnten nur einem kleinen Teil ihrer Patienten langfristig helfen. Antikörpertherapien, Antitumorvakzinierungen oder gar genspezifische, individualisierte Therapieformen existierten zwar als Visionen, schienen aber Mitte der 90er Jahre von einer klinischen Anwendung noch weit entfernt. Nach heutiger Auffassung stehen in erster Linie genetische Schäden am Anfang einer Tumorerkrankung. Das Verständnis der Natur des jeweiligen Schadens ist der Schlüssel zu einer gezielten, sog. „targeted therapy“.

Mit der Einführung der „targeted therapy“ in der klinischen Praxis veränderten sich das Denken und die Vorstellungen in der Onkologie grundsätzlich, denn diese Therapeutika konnten den Ärzten und Patienten neue Perspektiven im Bereich der Tumorthherapie eröffnen.

Der mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Inhibitor RAD001 stellt eine solche „targeted therapy“ dar.

### 6.1 Wirkung von RAD001 auf humane Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

**mTOR** (*mammalian Target of Rapamycin*) ist ein Protein, an welches das Makrolidantibiotikum Rapamycin im Komplex mit dem Immunophilin FK506-Bindungsprotein-12 (FKBP-12) bindet und dadurch in seiner Funktion inhibiert wird. mTOR ist an der Regulierung der zentralen katabolischen und anabolischen Prozesse beteiligt. Als Antwort auf optimale Wachstum-Stimuli fördert mTOR die ribosomale Biogenese und Proteintranslation, die zu einer Proliferationsbeschleunigung führen (Haritunians *et al.*, 2007), (Thomson *et al.*, 2009), (Tsang *et al.*, 2007). Somit ist mTOR ein vielversprechender Therapie-Ansatz für das Mantelzell-Lymphom.

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigten mTOR-Inhibitoren eine Hemmung des Tumorstwachstums beim Mantelzell-Lymphom (Haritunians *et al.*, 2007), (Yee *et al.*, 2006),

(Panwalkar et al., 2004). In klinischen Studien konnte Rapamycin einen Progressionsfortschritt von fast 40% bei fortgeschrittenem MCL erzielen (Sabatini, 2006), (Dancey, 2006).

Das bessere Ansprechen im Vergleich zu anderen Non-Hodgkin-Lymphomen ist durch eine verminderte Expression des Cyclin D1-Proteins nach der Behandlung mit mTOR-Inhibitoren zu erklären (Costa, 2007), (Panwalkar et al., 2004).

Die Aktivierung von PI3K/Akt bewirkt in MCL-Zelllinien zu einer therapeutischen Resistenz und ist mit einem schlechten Outcome assoziiert (Rodriguez et al., 2010), (Drakos et al., 2009). Diese Signalweg-Aktivierung führt zu einer vermehrten Phosphorylierung und somit zu einer gesteigerten Aktivierung von mTOR und seinen Zielproteinen 4E-BP1 und p70S6K1 (Peponi et al., 2006), (Witzig and Kaufmann, 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine gezielte Hemmung von mTOR *in vitro* durch den mTOR-Inhibitor RAD001 in Mantelzell-Lymphom-Zelllinien zu einer Proliferationshemmung dieser Zellen führte.

Nach 48 Stunden Inkubation mit 2  $\mu$ M RAD001 lag die Zahl der viablen Zellen zwischen 48% und 69% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die antiproliferative Wirkung von RAD001 bei Mantelzell-Lymphom-Zelllinien wurde 2007 auch in einer *in vitro* Studie von Haritunians et al. beschrieben (Haritunians et al., 2007). Hierbei war die MCL-Zelllinie NCEB-1 die resistanteste der untersuchten Zelllinien. Der Nachweis von Mausechromosomen und die Expression maushomologer Gene wie bcl-2 könnte einen Grund für die Unempfindlichkeit dieser Zelllinie gegenüber dem mTOR-Inhibitor darstellen (Camps et al., 2006).

Den stärksten antiproliferativen Effekt hatte der mTOR-Inhibitor auf die MCL-Zelllinien Z-138, Jeko-1 und Granta 519. Weniger empfindlich waren die MCL-Zelllinien Rec-1 und HBL-2.

Diese Ergebnisse konnten durch Zellzyklusanalysen nach 48- bzw. 72-stündiger Inkubation bestätigt werden. Auch hier wiesen die Zelllinien Jeko-1 und Z 138 starke Verschiebungen im Zellzyklus auf. Interessanterweise zeigte dabei die Zelllinie NCEB-1 die stärksten Verschiebungen im Zellzyklus, obwohl sich diese Zelllinie im Trypanblau-Ausschluss-Test als eine der resistantesten Zellen erwiesen hatte. Eine der möglichen Erklärungen für dieses Phänomen ist, dass es durch das Blockieren des mTOR-Inhibitors zu einer Aktivierung eines alternativen Signaltransduktionswegs kommt, und somit die Wachstumshemmung von mTOR überwunden wird. Beispiele dieses

Phänomenes sind bereits im Zusammenhang mit den PI3K/mTOR-Hemmstoffen beschrieben worden. Zum Beispiel führt eine prolongierte Behandlung mit einem mTOR-Inhibitor zu einer Verschiebung des Gleichgewichts von Raptor-mTOR zum Rictor-mTOR-Signalpfad, der wiederum seinerseits Akt aktivieren kann (Abb.3) (Witzig and Kaufmann, 2006).

In allen MCL-Zelllinien sowie in der Kontrollzelllinie Jurkat zeigte sich nach der RAD001-Exposition in der Zellzyklusanalyse eine Zunahme der G0/G1- und eine Abnahme der S-Phase. Neuere Studien zeigen, dass der Zellzyklusarrest durch die „downstream“ gelegenen Effektoren vom mTOR - p70S6K1, 4E-BP1 und eIF4E - reguliert wird. So wurde über eine mögliche Regulierung von der Cyclin D1-Expression durch eIF4E berichtet (Haritunians et al., 2007).

Diese Beobachtungen decken sich mit denen der Arbeitsgruppe von Yee et al., die zeigen konnte, dass RAD001 die Funktion von mTOR hemmt, indem es an das intrazelluläre Rezeptormolekül FKBP-12 bindet und somit die ribosomale Protein S6 Kinase 1 inaktiviert. Zusätzlich wird die  $\kappa$ -abhängige Initiation der Translation über den 4E-BP1/eIF4E Signalweg inhibiert, was zu einer Akkumulation der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus führt (Yee et al., 2006).

Die Untersuchungen von Peponi et al. konnten zeigen, dass die Behandlung mit einem PI3K-Inhibitor LY294002 und einem mTOR-spezifischen siRNA ebenso zu einem G1-Zellzyklusarrest führt, der mit der Herabregulierung von Cyclin D1 und einer Zunahme der Zellzyklusinhibitoren p21 and p27 assoziiert ist (Peponi et al., 2006).

Durch weitere durchflusszytometrische Analysen konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass die Behandlung von MCL-Zelllinien mit RAD001 nicht zu einer Apoptoseinduktion führt. Durch die Kombination mit Bendamustin, Fludarabin und Bortezomib wurde in niedrigen Konzentrationen keine wesentliche Apoptoseinduktion erzielt. Die Kombination von RAD001 und Bendamustin wirkte in den Zelllinien Jeko-1, HBL-2 und Rec-1 sogar eher Apoptose hemmend. Diese Beobachtungen wurden auch von Hipp et al. beschrieben, dessen Arbeitsgruppe eine antiapoptotische Wirkung des mTOR-Inhibitors Rapamycin in den drei MCL-Zelllinien NCEB-1, Jeko-1 und Granta 519 nachweisen konnte (Hipp et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass RAD001 in den MCL-Zelllinien vor allem eine Zunahme der G0/G1- bei gleichzeitiger Abnahme der S-Phase bewirkte. Diese Beobachtung könnte man sich für die Entwicklung neuer Kombinationen mit anderen Therapeutika zunutze machen. Da RAD001 zu einer Synchronisation der Zellen in der G1-

Phase führte, könnte dieser mTOR-Inhibitor die Wirkung jener Zytostatika verstärken, die vor allem ihre Wirkung in der G1-Phase entfalten. Im Gegensatz dazu könnte der mTOR-Inhibitor die Wirkung jener Zytostatika, die in anderen Phasen des Zellzyklus angreifen, abschwächen.

Eine Wirkungsverstärkung von RAD001 in Kombination mit etablierten Chemotherapeutika wurde bei verschiedenen Tumorerkrankungen *in vitro* nachgewiesen. So konnte zum Beispiel die Studiengruppe von Haritunians et al. in MCL-Zelllinien synergistische Effekte bei RAD001 in Kombination mit Ara-C, Danorubicin, Idarubicin und Fluvastatin nachweisen (Haritunians et al., 2007), (Rodriguez et al., 2010). Die Kombination von Vincristin und RAD001 ist bei ALL sowohl *in vitro* als auch *in vivo* effektiv. Vor kurzem wurde auch ein ausgeprägter Synergismus zwischen einem pan-VEGF-R Kinase-Inhibitor und RAD001 in einem metastasierten Melanom-Modell *in vivo* gezeigt (O'Reilly et al., 2011). Eine andere Forschungsgruppe wiederum konnte in einigen Tumor-Zelllinien antiproliferative Effekte von RAD001 in Kombination mit Doxorubicin, 5-Fluorouracil und Patupilon nachweisen. Diese Wachstumshemmung war mit einer dosisabhängigen Abnahme des pS6-Gehalts, einem downstream gelegenen Protein des mTOR-Signalpfades, vereinbar (O'Reilly et al., 2011). Eine weitere Studie belegte die additiven und synergistischen Interaktionen von RAD001 in Kombination mit Cisplatin, Paclitaxel, Gemcitabin und Doxorubicin *in vitro* (O'Reilly et al., 2011). So konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die oben genannten Kombinationen additive bis stark synergistische Interaktionen bei den Tumor-Zelllinien A-549, KB-31 und HCT-116 hervorriefen (O'Reilly et al., 2011). Die Kombination von RAD001 und Gemcitabin wies bei sechs NHL-Zelllinien eine synergistische Wirkung, die Kombination von RAD001 mit Paclitaxel zusätzlich noch additive Effekte auf. Eine antagonistische Wirkung dagegen zeigte die Kombination von RAD001 und Vinorelbin (Chiang et al., 2010).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Nukleosidanalogen Fludarabin, die Antimetabolite Cytarabin und Bendamustin sowie der PKC $\beta$ -selektive Inhibitor Enzastaurin und der Proteasom-Inhibitor Bortezomib wurden in Kombination mit RAD001 verabreicht. Die für diese Experimente ausgewählten Medikamentendosierungen lagen unter den IC50-Werten. Diese Dosierungen hatten in der Monotherapie nur eine geringe Auswirkung auf die Proliferations- und Apoptoserate.

Die Kombinationen mit den oben genannten Kombinationspartnern zeigen eine deutliche Überlegenheit dieser Kombinationen gegenüber der Behandlung mit RAD001 alleine. Bei allen oben genannten Kombinationen konnte nach 72 Stunden Expositionszeit bei den

untersuchten MCL-Zellreihen vorwiegend eine additive Wirkung festgestellt werden. Eine antagonistische Wirkung zeigte dagegen die Kombination von RAD001 und Bortezomib sowie Fludarabin und Forodesin+dGuo. Ein Synergismus ließ sich dagegen bei der Zelllinie Jeko-1 nach der Behandlung mit RAD001 in Kombination mit Fludarabin oder Forodesin+dGuo feststellen. Die Zelllinie Granta 519, die sich wie die Zelllinie Jeko-1 als eine sensible Zelllinie gegenüber dem mTOR-Inhibitor im Trypanblau-Ausschluss-Test erwies, zeigte bei der Kombination von RAD001 und Enzastaurin ebenfalls synergistische Effekte. Diese Beobachtungen ließen sich jedoch nicht auf alle MCL-Zelllinien verallgemeinern.

In einer kürzlich durchgeführten *in vitro* Studie konnte gezeigt werden, dass RAD001 die Cisplatin-induzierte Apoptose in p53-Wildtyp-Zelllinien erhöhen kann (Beuvink et al., 2005). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass besonders die Kombination von dem mTOR-Inhibitor und dem Antimetabolit Cytarabin in den p53-Wildtyp-Zellen die Apoptoserate erhöhen würde. Dabei fungiert p53 als ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Apoptose, den Zyklusarrest oder die Zelldifferenzierung reguliert (Beuvink et al., 2005). Die Kombination von RAD001 und Cytarabin zeigte in der vorliegenden Arbeit nach 48 Stunden Exposition eine antagonistische Wirkung in den Zelllinien Z 138 (Wildtyp), Rec-1 (Wildtyp), Granta 519 (Wildtyp) und HBL-2 (mutiert). Eine additive Wirkung ließ sich bei den Zelllinien Z 138, Rec-1, Granta 519, HBL-2 sowie bei der Zelllinie Jeko-1 (Wildtyp) detektieren. Somit konnte in dieser Arbeit die erhöhte Sensibilität der Cisplatin-induzierten Apoptose in p53-Wildtyp-Zelllinien in Kombination mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 nicht bestätigt werden.

Diese Ergebnisse betonten weitestgehend die Heterogenität der MCL-Zelllinien und somit die komplexen Zusammenhänge in der Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Kombinationen von RAD001 mit Fludarabin, Cytarabin, Enzastaurin, Bortezomib und Bendamustin eine Wirkungsverstärkung zeigten und im Rahmen klinischer Studien einen neuen Ansatz zur Therapie des Mantelzell-Lymphomas darstellen könnten (Haritunians et al., 2007).



## 6.2 Wirkung von Forodesin+dGuo auf humane Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

Substanzen wie Fludarabin oder Cytarabin gehören zur Gruppe der Nukleosidanaloga und werden zur Therapie von Patienten mit Mantelzell-Lymphom eingesetzt (Hiddemann and Dreyling, 2003). Während Nukleosidanaloga keine „targeted“ Therapeutika darstellen, scheinen Purin-Nukleosid-Phosphorylase-Inhibitoren selektiver zu sein (Bieghs *et al.*, 2010), (Kilpatrick *et al.*, 2003), (Bantia *et al.*, 2003).

Forodesin ist ein potenter und ein spezifischer PNP-Inhibitor, der in Gegenwart von dGuo eine Hemmung der Zellproliferation bewirkt, indem es zu einer Akkumulation des dGTP-Levels führt (Alonso *et al.*, 2009). Dieser hohe dGTP-Level verursacht wiederum eine Hemmung von Ribonukleotidreduktase, einem Enzym, das für die DNA-Synthese erforderlich ist.

B-CLL-Zellen weisen *in vitro* eine hohe Aktivität der Desoxycytidin-Kinase (dCK) auf und könnten somit durch Forodesin+dGuo in ihrer Aktivität gehemmt werden (Balakrishnan *et al.*, 2006). Auf diesen Daten aufbauend, wurde eine Phase II-Studie mit Forodesin in CLL Patienten begonnen (Balakrishnan *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit führte die Behandlung von MCL-Zelllinien mit 10  $\mu$ M Forodesin+1  $\mu$ M dGuo zu einem proliferationshemmenden Effekt (58%-79% der Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach 48 Stunden und 50%-72% nach 72 Stunden Behandlungszeit). Der T-Zell-spezifische Effekt konnte durch eine höhere proliferationshemmende Wirkung bei der Zelllinie Jurkat (23% der Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach 48 Stunden und 36% nach 72 Stunden) bestätigt werden. Diesen Effekt von Forodesin in Gegenwart von 2'-Desoxyguanosin auf die Proliferation von T-Lymphozyten zeigte ebenfalls Banita *et al.* (Bantia *et al.*, 2003).

Die weiteren Zellzyklus-Analysen in MCL-Zelllinien nach der Behandlung mit Forodesin erhärteten diese Befunde. Ganz anders stellte sich die Zellzyklus-Analyse der T-ALL-Zelllinie Jurkat dar. Nach 48 Stunden Behandlungszeit mit 10  $\mu$ M Forodesin kam es zu einem höheren Anstieg des prozentualen Anteils der G1-Phase Zellen sowie zu einer deutlicheren Reduktion des Anteils der S-Phase-Zellen. Eine Zunahme der sub-G1-Phase ließ sich vor allem nach der Behandlung mit 10  $\mu$ M Forodesin feststellen. Desweiteren zeigten sich im Verlauf bei einer Forodesin-Konzentration sowohl von 10  $\mu$ M als auch von 1  $\mu$ M nach 72 Stunden eine weniger deutlichere Zell-Reduktion der S-Phase.

Die T-Zell-Spezifität ist aufgrund der physiologisch stärkeren Phosphorylierung von dGuo und durch den langsameren Katabolismus der phosphorylierten dGTP zu erklären (Bieghs *et al.*, 2010). So konnte Kicska *et al.* bestätigen, dass diese Effekte für die T-Zelllinien spezifisch waren, es gab keinen Effekt auf die Proliferation der humanen B-Zell-Leukämie-Linien BL2, SKW 4.2 und der humanen Colon-Carcinom-Zelllinie GEO (Kicska *et al.*, 2001). Eine wichtige Beobachtung bestand darin, dass Forodesin in Kombination mit dGuo keine toxische Wirkung auf normale nicht stimulierte periphere T-Zellen hatte. Es konnte aber eine deutlich unterdrückte Proliferation von aktivierten T-Zellen nach der Behandlung mit Forodesin und dGuo festgestellt werden (Kicska *et al.*, 2001).

Durch weitere durchflusszytometrische Analysen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Behandlung mit Forodesin (1  $\mu\text{M}$ )+dGuo (0,1  $\mu\text{M}$ ) bei MCL-Zelllinien zu keiner Apoptoseinduktion führte. So wies die MCL-Zelllinie Rec-1 nach der Behandlung mit Forodesin+dGuo einen Anteil an nicht apoptotischen Zellen von 98% auf. Für die Zelllinie HBL-2 ergab sich nach 72 Stunden ein Anteil von 97,5 % an nicht apoptotischen Zellen. Alle MCL-Zelllinien waren gegenüber den PNP-Inhibitoren resistent. Der Grund für diese Resistenz könnte eine nicht ausreichende dGTP-Akkumulation in den MCL-Zelllinien sein. MCL-Zelllinien könnten z.B. dGuo vermindert aufnehmen und/oder eine erhöhte dGMP-Aktivität aufweisen. Diese Hypothesen wurden durch die Ergebnisse von Kicska *et al.* insofern bestätigt, dass Forodesin zwar die Apoptose in den humanen T-Zelllinien, nicht aber in der BL2 (B-Zell-Leukämie-Zelllinie) induzieren konnte (Kicska *et al.*, 2001).

Balakrishnan *et al.* konnte wiederum zeigen, dass Forodesin in CLL-Zelllinien die Apoptose durch die Phosphorylierung von p53 und Aktivierung von p21 induzierte (Balakrishnan *et al.*, 2006). Alonso *et al.* wies nach, dass die intrinsische mitochondriale Apoptose-Kaskade in CLL-Zelllinien nach der Behandlung mit Forodesin durch die p73-Induktion unabhängig vom p53-Status vermittelt wurde (Alonso *et al.*, 2009), (Roue *et al.*, 2008).

Interessanterweise zeigte in dieser Arbeit auch die T-ALL-Zelllinie Jurkat bei der Behandlung mit Forodesin (1  $\mu\text{M}$ )+dGuo (0,1  $\mu\text{M}$ ) innerhalb von 72 Stunden keine Apoptose. Zu einem anderem Ergebnis kam die Arbeitsgruppe von Bantia *et al.*, die allerdings für die Apoptoseassays eine höhere Konzentration von dGuo 10  $\mu\text{M}$  einsetzte (Bantia *et al.*, 2003) und die Arbeitsgruppe von Kicska *et al.*, die ebenso eine höhere Konzentration von dGuo (20  $\mu\text{M}$ ) verwendete (Kicska *et al.*, 2001). Beide Gruppen wie-

sen nach, dass Forodesin in Kombination mit dGuo bei den malignen T-Zell-Linien Apoptose induzierte (Kicska et al., 2001). Die niedrigeren Konzentrationen von Forodesin bei einer Dosierung von 1  $\mu\text{M}$ +dGuo 0,1  $\mu\text{M}$  haben möglicherweise bei den MCL-Zelllinien als auch bei der T-ALL-Zelllinie Jurkat eine antiproliferative Wirkung, zeigen aber bei dieser Dosierung keine proapoptotische Aktivität.

Obwohl PNP in allen Säugetier-Zellen vorhanden ist, scheinen die T-Zellen auf den Mangel dieses Enzyms besonders empfindlich zu sein (Bantia et al., 2003). Die Hemmung dieses Enzyms führt zu einer Ansammlung von dGTP und somit zur Hemmung der DNA-Synthese, was letztlich den Zelltod bewirkt (Gandhi et al., 2005).

Zusammenfassend ist Forodesin ein wirksames und selektives Therapeutikum, welches das Wachstum von humanen T-Zell-Leukämie-Zelllinien unterdrückt, indem es Apoptose indiziert, ohne dabei jedoch normale T-Zelllinien zu beeinflussen (Kicska et al., 2001), (Gandhi et al., 2005), (Bantia et al., 2003).

In mehreren soliden Tumoren und in malignen B-Zellen (Gandhi and Balakrishnan, 2007) wird, wie in dieser Arbeit gezeigt, bei der Inkubation mit Forodesin in Kombination mit dGuo bei MCL-Zelllinien zwar eine antiproliferative Wirkung, aber kaum eine Beeinflussung des Zellzyklus und auch der Apoptose nachgewiesen. Eine partielle Nukleosidanaloga-Resistenz könnte die fehlenden Veränderungen in den Zellzyklus- und Apoptose-Assays in MCL-Zelllinien erklären. Die dafür verantwortlichen molekularen Mechanismen werden derzeit intensiv untersucht. Das Fehlen einer intrazellulären Medikamentenakkumulation ist dabei ein wichtiger und allgemein identifizierter Mechanismus (Galmarini et al., 2001). Eine intrazelluläre Nukleosid-Akkumulation wird durch die Nukleosid-Transportkapazität an der zellularen Plasmamembran und durch das Gleichgewicht zwischen den katabolischen und anabolischen zytoplasmatischen Enzym-Aktivitäten bestimmt (Reiman et al., 2002).

Natürliche Nukleoside sind hydrophile Moleküle, die mittels spezifischer Transporter NTs: hENT1, hENT2 und hCNT1, hCNT2, hCNT3 in die Zelle gelangen. Der hENT1-Transporter kommt ubiquitär vor und stellt den hauptsächlichen Mechanismus für die Aufnahme von Nukleosidanaloga dar (Reiman et al., 2002). Eine effektive Aufnahme der Polymerase-Inhibitoren in die Zielzelle ist die Voraussetzung für ihre Wirksamkeit. Eine Mutation in der hENT1-Kodierungsregion oder dessen Mangel könnten die Ursache für die reduzierte Medikamenten-Aufnahme und Nukleosid-Chemoresistenz in den MCL-Zelllinien sein (Reiman et al., 2002).

Reiman et al. erforschten die potenziellen Mechanismen der Nukleosidanaloga-Resistenz bei einem MCL-Patienten (Reiman et al., 2002). Das dabei beobachtete Genexpressionsprofil in den MCL-Zellen beinhaltete eine erhöhte Expression an hENT1 und dCK. Folglich konnte eine Mutation in der Kodierungsregion von hENT1 und dessen Mangel als Ursache der reduzierten Medikamenten-Akkumulation und Nukleosidanaloga-Chemoresistenz ausgeschlossen werden.

Potenziell können Alterationen in der RNA-Prozessierung oder in der RNA-Translation bzw. eine posttranslationale Modifikation das beobachtete Defizit im Nukleosid-Transport und in der Akkumulation erklären. Diese Mechanismen sollten in weiteren *in vitro* Studien untersucht werden, da in dieser Arbeit Forodesin+dGuo eine antiproliferative Restaktivität auf die MCL-Zelllinien aufwies.

Als Monotherapeutika zeigte Forodesin (1  $\mu\text{M}$ ) unter Beigabe von dGuo (0,1  $\mu\text{M}$ ) eine geringe proliferationshemmende Wirkung auf die untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Wirkung von Forodesin+dGuo in Kombination mit Cytarabin, Fludarabin, Enzastaurin, Bortezomib und Bendamustin auf die MCL-Zelllinien konnte wichtige Hinweise darauf geben, welche potentiellen Kombinationen in der Behandlung des MCLs in weiteren Studien geprüft werden sollten.

Die Kombination von Forodesin+dGuo und Bendamustin zeigte in dieser Arbeit bei vier von fünf MCL-Zelllinien nach 72 Stunden Expositionszeit und bei der T-ALL-Zelllinie nach 48 Stunden eine additive Wirkung. Ein synergistischer Effekt war nach 48 Stunden lediglich bei der Zelllinie Jeko-1 zu erkennen. Einen potenten synergistischen Effekt konnte ebenso die Arbeitsgruppe von Alonso et al. in CLL-Zelllinien feststellen (Alonso et al., 2009). Bendamustin aktivierte genauso wie Forodesin p53-unabhängig die intrinsische mitochondriale Apoptose-Kaskade (Roue et al., 2008). Somit lässt sich dieser synergistische Effekt der Kombination von Bendamustin und Forodesin erklären.

Die Kombination von Forodesin+dGuo und Bortezomib führte bei der Koinkubation in vier MCL-Zelllinien und in der Kontrollzelllinie Jurkat zu einer antagonistischen, bei der Zelllinie Jeko-1, die keine p53 Protein-Expression aufwies, dagegen zu einer additiven Wirkung. Ein bedeutender Mechanismus der zytotoxischen Wirkung von Bortezomib war die Rekrutierung von p53. Forodesin löste in den MCL-Zelllinien dagegen eine intrinsische mitochondriale Apoptose-Kaskade durch die p73-Induktion aus. Die Homologie im Bereich der DNA-Bindedomäne liegt zwischen p53 und p73 bei ca. 60%, sodass p73 die gleichen Zielpromotoren wie p53 aktivieren und dementsprechend einen Zellzyklusarrest

und eine Apoptose auslösen kann. Die Zielgene, die einen Zellzyklusarrest und eine Apoptose bewirken, sind tatsächlich zum großen Teil p53-Targets, z.B. Bax, NOXA und u.a. PUMA (Kaghad et al., 1997).

Die Applikation von Forodesin+dGuo und Enzastaurin hatte bei zwei MCL-Zelllinien synergistische Effekte, eine additive Wirkung wurde bei drei der MCL-Zelllinien nachgewiesen. Ebenfalls eine additive Wirkung ergab sich bei der Kontrollzelllinie Jurkat.

Die Kombination von Forodesin+dGuo mit Fludarabin zeigte dagegen eine antagonistische Wirkung bei allen untersuchten Zelllinien, eine Ausnahme stellte lediglich die Zelllinie Jeko-1 dar. Eine *in vitro* Studie von Alonso et al. untersuchte die Kombination von Forodesin (2  $\mu$ M) und dGuo (10-20  $\mu$ M) mit Fludarabin (3.75-7.5  $\mu$ M) bei der CLL-Zelllinie *in vitro*. Dabei konnte ebenfalls keine Zunahme des zytotoxischen Effekts dieser beiden Substanzen im Vergleich zum zytotoxischen Effekt der einzelnen Substanzen nachgewiesen werden. Die Kombination aus beiden Substanzen zeigte sogar eine antagonistische Wirkung (Alonso et al., 2009). Da Fludarabin durch dCK zu seinem aktiven 5-Triphosphat-Metabolit phosphoryliert wird, kann dieser Antagonismus durch das Konkurrieren der Phosphorylierung von dGuo und Fludarabin erklärt werden.

Die Kombination des Purin-Nukleosid-Phosphorylase-Inhibitor Forodesin mit dGuo zeigte in Kombination mit Cytarabin vorwiegend eine additive Wirkung. Drei MCL-Zelllinien wiesen bei der Anwendung des oben genannten Kombinationsmusters, ebenso wie die Kontrollzelllinie Jurkat, einen additiven Effekt auf.

Im nächsten Schritt steht nun die Bestätigung der soeben dargestellten Auswirkungen in weiteren *in vitro*-Experimenten an Patientenproben an. Außerdem könnte die Analyse höher dosierter Kombinationen von Forodesin+dGuo weitere wichtige Hinweise für die Kombinationstherapie des MCLs liefern.

### 7 Zusammenfassung

Das Mantelzell-Lymphom ist ein aggressives B-NHL, das durch die Expression des Zellzyklus-regulierenden Proteins Cyclin D1 charakterisiert ist. Diese Expression wird in den meisten Fällen durch eine chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32) ausgelöst.

Klinisch weist das MCL mit einem medianen Überleben von nur drei bis vier Jahren eine der schlechtesten Langzeitprognosen aller Lymphomsubtypen auf. In fortgeschrittenen Stadien kommt es zu frühzeitigen Rezidiven nach der Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika. Es besteht daher ein dringender Bedarf an neuen, effektiveren, molekular ausgerichteten Therapieformen, die zu einer Verbesserung der Prognose und der Lebensqualität der Patienten führen.

In dieser Arbeit wurde hierfür das Proliferationsverhalten und die Viabilität von sechs humanen MCL-Zelllinien nach der Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 und dem Purin-Nukleosid-Phosphorylase-Inhibitor Forodesin in Gegenwart von 2'-Desoxyguanosin (dGuo) untersucht.

Im Vordergrund stand zum einen die Charakterisierung der Wirkung von RAD001 und Forodesin+dGuo als Monosubstanzen. Zum anderen war es auch Ziel, die Antitumorwirkung zytotoxischer Kombinationen mit etablierten Substanzen der Chemotherapie, dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib sowie dem PKC $\beta$ -Inhibitor Enzastaurin bezüglich Wachstumshemmung, Zelltod und Apoptose zu untersuchen und diese Kombinationen auf antagonistische, additive oder synergistische Interaktionen hin zu analysieren.

Die behandelten Zellen wurden hierzu einem Viabilitäts-Trypanblau-Test unterzogen, der hier als Screeningverfahren diente, um die Empfindlichkeit der Zellen auf unterschiedliche Dosen in Einzel- und Kombinationstherapien zu quantifizieren. Im Anschluss wurden die Resultate mit Hilfe der Zellzyklusanalyse durch Propidiumiodid-Färbung und Apoptose-Assays verifiziert und der Wirkmechanismus der Kombinationen differenziert.

Als Ergebnis dieser Arbeit erzielte der mTOR-Inhibitor RAD001 als Monosubstanz bereits in subtoxischen Konzentrationen vor allem nach 48- und 72-stündiger Expositionsdauer eine antiproliferative Wirkung auf die MCL-Zelllinien. Außerdem zeigte RAD001 bei allen in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien eine potente Inhibition des Zellzyklus, mit einer Zunahme der G0/G1- und einer Abnahme der S-Phase.

Nach 48-stündiger Behandlung mit RAD001 in Kombination mit Fludarabin, Cytarabin, Bendamustin sowie Enzastaurin und Bortezomib zeigte sich bei einer Zelllinie ein Synergismus, die im Viabilitäts-Trypanblau-Test besonders empfindlich auf RAD001 war. Additive Effekte konnten bei vier von fünf untersuchten MCL-Zelllinien durch die Kombination von RAD001 und Bendamustin nachgewiesen werden. Bei zwei von fünf Zelllinien konnten diese Effekte auch mit Fludarabin erzielt werden. Vier von fünf MCL-Zelllinien zeigten nach 48-stündiger Behandlung bei der Kombination von RAD001 plus Cytarabin eine antagonistische Wirkung. Die Behandlung mit der Kombination von RAD001 plus Bortezomib oder Enzastaurin führte in einigen MCL-Zelllinien ebenso zu additiven Effekten. Die Kombinationen RAD001 plus Forodesine+dGuo und RAD001 plus Bortezomib wiesen in drei von fünf MCL-Zelllinien dagegen eine antagonistische Wirkung auf.

Nach der Behandlung mit Forodesin unter Beigabe von dGuo konnte ebenfalls eine antiproliferative Wirkung in allen untersuchten MCL-Zelllinien induziert werden. Die weiteren Untersuchungen mithilfe von Zellzyklus- und Apoptose-Analysen zeigten jedoch keine wesentlichen Veränderungen im Vergleich zu der jeweiligen unbehandelten Kontrolle. Ganz anders stellte sich die Zellzyklus-Analyse der T-ALL-Kontrollzelllinie Jurkat dar. Hier zeigte sich eine deutliche T-Zelllinien-spezifische Wirkung des PNP-Inhibitors Forodesin unter Zugabe von 2'-Desoxyguanosin.

Die Kombination von Forodesin+dGuo und Bendamustin wies bei vier von fünf MCL-Zelllinien nach 72 Stunden Expositionszeit ebenso eine additive Wirkung auf. Ein synergistischer Effekt war nach 48 Stunden dagegen lediglich bei einer MCL-Zelllinie zu erkennen. Die Kombination von Forodesin und Fludarabin zeigte schließlich nach 72 Stunden Expositionszeit bei vier MCL-Zelllinien und der T-ALL-Zelllinie Jurkat eine antagonistische Wirkung, was letztendlich auf das Konkurrieren der Phosphorylierung von dGuo und Fludarabin zurückzuführen ist.

Bei vier von fünf untersuchten MCL-Zelllinien wies die Kombination von Forodesin+dGuo und Bortezomib ebenfalls eine antagonistische Wirkung auf, da die beiden Kombinationspartner um DNA-Bindungsstellen konkurrieren.

Eine additive Wirkung ließ sich am Ende auch bei drei von fünf MCL-Zelllinien mit der Kombination von Forodesin+dGuo plus Enzastaurin nachweisen.

Zusammenfassend wäre somit ein Einsatz des mTOR-Inhibitors RAD001 und des Purin-Nukleosid-Phosphorylase-Hemmstoffs Forodesin in Gegenwart von 2'-Desoxyguanosin additiv zu anderen Chemotherapeutika im Rahmen der Mantelzell-Lymphom-Therapie

durchaus vielversprechend. Allerdings sind bei der Entwicklung dieser und weiterer, innovativer Kombinationen die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu beachten, um mögliche antagonistische Wirkungen zu vermeiden.



## 8 Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
BCL-2	Inhibitor des programmierten Zelltods (Apoptose)
B-CLL	Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ
BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
B-NHL	B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom
CHK2	Checkpoint-Kinase 2
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin (Oncovir®), Prednison
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CR	Komplettes Ansprechen (Complete Response)
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
dGuo	2'-Desoxyguanosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
4E-BP1	eukaryotischen Elongationsfaktor 4E Bindungsprotein 1
eIF4E	eukaryotic initiation factor 4E
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorter)
FCM	Kombinationschemotherapie aus Fludarabin, Mitoxantron und Cyclophosphamid
FKBP-12	Intrazelluläres Immunophilin FK506-Bindungsprotein 12
HDAC	Histon-Deacetylase
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IgH	Immunglobulin Heavy Chain
LDH	Laktatdehydrogenase
MCL	Mantelzell-Lymphom
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
P27	Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor
P53	Tumorsuppressor-Gen
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKC- $\alpha$	Proteinkinase C- $\alpha$

## Abkürzungsverzeichnis

---

PNP	Purin-Nukleosid-Phosphorylase
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
Rb	Retinoblastom-Protein
pS6	phosphoryliertes ribosomales Protein S6
R	Rituximab
SCT	Stammzelltransplantation (Stem Cell Transplantation)
siRNA	Small interfering RNA
SSC	Sidewards Scatter
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## 9 Literaturverzeichnis

- Aguirre D, Boya P, Bellet D and others. 2004. Bcl-2 and CCND1/CDK4 expression levels predict the cellular effects of mTOR inhibitors in human ovarian carcinoma. *Apoptosis* 9(6):797-805.
- Alao JP. 2007. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer* 6:24.
- Alonso R, Lopez-Guerra M, Upshaw R and others. 2009. Forodesine has high antitumor activity in chronic lymphocytic leukemia and activates p53-independent mitochondrial apoptosis by induction of p73 and BIM. *Blood* 114(8):1563-1575.
- Amin HM, McDonnell TJ, Medeiros LJ and others. 2003. Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines. *Arch Pathol Lab Med* 127(4):424-431.
- Balakrishnan K, Nimmanapalli R, Ravandi F and others. 2006. Forodesine, an inhibitor of purine nucleoside phosphorylase, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 108(7):2392-2398.
- Bantia S, Ananth SL, Parker CD and others. 2003. Mechanism of inhibition of T-acute lymphoblastic leukemia cells by PNP inhibitor--BCX-1777. *Int Immunopharmacol* 3(6):879-887.
- Bertoni F, Ponzoni M. 2007a. The cellular origin of mantle cell lymphoma. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39(10):1747-1753.
- Bertoni F, Ponzoni M. 2007b. The cellular origin of mantle cell lymphoma. *Int J Biochem Cell Biol* 39(10):1747-1753.
- Beuvink I, Boulay A, Fumagalli S and others. 2005. The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation. *Cell* 120(6):747-759.
- Bieghs L, Caers J, De Bruyne E and others. 2010. The effects of forodesine in murine and human multiple myeloma cells. *Adv Hematol* 2010:131895.
- Bjornsti MA, Houghton PJ. 2004. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4(5):335-348.
- Camps J, Salaverria I, Garcia MJ and others. 2006. Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines. *Leuk Res* 30(8):923-934.
- Chiang CT, Yeh PY, Gao M and others. 2010. Combinations of mTORC1 inhibitor RAD001 with gemcitabine and paclitaxel for treating non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Lett* 298(2):195-203.

- Chiang GG, Abraham RT. 2007. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med* 13(10):433-442.
- Costa LJ. 2007. Aspects of mTOR biology and the use of mTOR inhibitors in non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Treat Rev* 33(1):78-84.
- Crazzolara R, Cisterne A, Thien M and others. 2009. Potentiating effects of RAD001 (Everolimus) on vincristine therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 113(14):3297-3306.
- Dancey JE. 2006. Therapeutic targets: MTOR and related pathways. *Cancer Biol Ther* 5(9):1065-1073.
- Drakos E, Atsaves V, Li J and others. 2009. Stabilization and activation of p53 downregulates mTOR signaling through AMPK in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 23(4):784-790
- Drexler HG, MacLeod RA. 2006. Mantle cell lymphoma-derived cell lines: unique research tools. *Leuk Res* 30(8):911-913.
- Dreyling M, Hiddemann W. 2008. Dose-intense treatment of mantle cell lymphoma: can durable remission be achieved? *Curr Opin Oncol* 20(5):487-494.
- Dreyling M, Unterhalt M, Weigert O and others. 2007. Therapie des Mantelzelllymphoms. *Der Internist* 48(4):382-388.
- Fernandez V, Hartmann E, Ott G and others. 2005. Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol* 23(26):6364-6369.
- Fisher RI. 1996. Mantle-cell lymphoma: classification and therapeutic implications. *Ann Oncol* 7 Suppl 6:S35-39.
- Fisher RI, Miller TP, O'Connor OA. 2004. Diffuse aggressive lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:221-236.
- Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. 2001. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* 15(6):875-890.
- Gandhi V, Balakrishnan K. 2007. Pharmacology and mechanism of action of forodesine, a T-cell targeted agent. *Semin Oncol* 34(6 Suppl 5):S8-12.
- Gandhi V, Kilpatrick JM, Plunkett W and others. 2005. A proof-of-principle pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical study with purine nucleoside phosphorylase inhibitor immucillin-H (BCX-1777, forodesine). *Blood* 106(13):4253-4260.
- Ghielmini M, Zucca E. 2009. How I treat mantle cell lymphoma. *Blood* 114(8):1469-1476.

- Goy A, Bernstein SH, Kahl BS and others. 2009. Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study. *Ann Oncol* 20(3):520-525.
- Hannan KM, Brandenburger Y, Jenkins A and others. 2003. mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol* 23(23):8862-8877.
- Hao S, Sanger W, Onciu M and others. 2002. Mantle cell lymphoma with 8q24 chromosomal abnormalities: a report of 5 cases with blastoid features. *Mod Pathol* 15(12):1266-1272.
- Haritunians T, Mori A, O'Kelly J and others. 2007. Antiproliferative activity of RAD001 (everolimus) as a single agent and combined with other agents in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 21(2):333-339.
- Harris N, Jaffe E, Diebold J and others. 1999. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. *Annals of Oncology* 10(12):1419-1432.
- Hess G, Smith SM, Berkenblit A and others. 2009. Temsirolimus in mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Semin Oncol* 36 Suppl 3:S37-45.
- Hiddemann W. 2004. *Lymphome: Neue Erkenntnisse und Therapiestrategien*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. S.3 von 227 p.
- Hiddemann W, Dreyling M. 2003. Mantle cell lymphoma: therapeutic strategies are different from CLL. *Curr Treat Options Oncol* 4(3):219-226.
- Hipp S, Ringshausen I, Oelsner M and others. 2005. Inhibition of the mammalian target of rapamycin and the induction of cell cycle arrest in mantle cell lymphoma cells. *Haematologica* 90(10):1433-1434.
- Hirama T, Koeffler H. 1995. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 86(3):841-854.
- Howard OM, Gribben JG, Neuberg DS and others. 2002. Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J Clin Oncol* 20(5):1288-1294.
- Jares P, Campo E. 2008. Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 142(2):149-165.

- Jares P, Colomer D, Campo E. 2007a. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nature Reviews Cancer* 7(10):750-762.
- Jares P, Colomer D, Campo E. 2007b. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7(10):750-762.
- Jundt F, Raetzl N, Muller C and others. 2005. A rapamycin derivative (everolimus) controls proliferation through down-regulation of truncated CCAAT enhancer binding protein  $\beta$  and NF- $\kappa$ B activity in Hodgkin and anaplastic large cell lymphomas. *Blood* 106(5):1801-1807.
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A and others. 1997. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90(4):809-819.
- Katzenberger T, Petzoldt C, Holler S and others. 2006. The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Am Soc Hematology*. p 3407-3407.
- Khoury IF, Lee MS, Saliba RM and others. 2003. Nonablative allogeneic stem-cell transplantation for advanced/recurrent mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 21(23):4407-4412.
- Kicska GA, Long L, Horig H and others. 2001. Immucillin H, a powerful transition-state analog inhibitor of purine nucleoside phosphorylase, selectively inhibits human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8):4593-4598.
- Kilpatrick JM, Morris PE, Serota DG, Jr. and others. 2003. Intravenous and oral pharmacokinetic study of BCX-1777, a novel purine nucleoside phosphorylase transition-state inhibitor. In vivo effects on blood 2'-deoxyguanosine in primates. *Int Immunopharmacol* 3(4):541-548.
- Klapper W, Hoster E, Determann O and others. 2009. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop* 2(2):103-111.
- Korycka A, Blonski JZ, Robak T. 2007. Forodesine (BCX-1777, Immucillin H)--a new purine nucleoside analogue: mechanism of action and potential clinical application. *Mini Rev Med Chem* 7(9):976-983.
- Korycka A, Lech-Maranda E, Robak T. 2008. Novel purine nucleoside analogues for hematological malignancies. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 3(2):123-136.

- Kouroukis CT, Belch A, Crump M and others. 2003. Flavopiridol in untreated or relapsed mantle-cell lymphoma: results of a phase II study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 21(9):1740-1745.
- Lenz G, Dreyling M, Hiddemann W. 2004. Mantle cell lymphoma: established therapeutic options and future directions. *Annals of Hematology* 83(2):71-77.
- Majewski M, Korecka M, Kossev P and others. 2000. The immunosuppressive macrolide RAD inhibits growth of human Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes in vitro and in vivo: A potential approach to prevention and treatment of posttransplant lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8):4285-4290.
- O'Reilly T, McSheehy PM, Wartmann M and others. 2011. Evaluation of the mTOR inhibitor, everolimus, in combination with cytotoxic antitumor agents using human tumor models in vitro and in vivo. *Anticancer Drugs* 22(1):58-78.
- Obrador-Hevia A, Mattos SF, Villalonga P and others. 2009. Molecular biology of mantle cell lymphoma: From profiling studies to new therapeutic strategies. *Blood Rev* 23(5):205-216.
- Ohtsubo K, Imamura R, Seki R and others. 2004. Blastoid variant of mantle cell lymphoma with lactic acidosis: a case report. *Int J Hematol* 80(5):428-431.
- Panwalkar A, Verstovsek S, Giles FJ. 2004. Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer* 100(4):657-666.
- Peponi E, Drakos E, Reyes G and others. 2006. Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma. *Am J Pathol* 169(6):2171-2180.
- Reiman T, Graham KA, Wong J and others. 2002. Mechanisms of resistance to nucleoside analogue chemotherapy in mantle cell lymphoma: a molecular case study. *Leukemia* 16(9):1886-1887.
- Rodriguez J, Gutierrez A, Obrador-Hevia A and others. 2010. Therapeutic concepts in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 85(5):371-386.
- Roue G, Lopez-Guerra M, Milpied P and others. 2008. Bendamustine is effective in p53-deficient B-cell neoplasms and requires oxidative stress and caspase-independent signaling. *Clin Cancer Res* 14(21):6907-6915.
- Rudolph C, Steinemann D, Von Neuhoff N and others. 2004. Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519. *Cancer Genet Cytogenet* 153(2):144-150.

- Rummel M, de Vos S, Hoelzer D and others. 2004. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma. *Leukemia and Lymphoma* 45(1):49-54.
- Sabatini DM. 2006. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 6(9):729-734.
- Salaverria I, Perez-Galan P, Colomer D and others. 2006. Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Haematologica* 91(1):11-16.
- Schliess F, Richter L, vom Dahl S and others. 2006. Cell hydration and mTOR-dependent signalling. *Acta Physiol (Oxf)* 187(1-2):223-229.
- Sources D. 1999. Mantle Cell Lymphoma. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 123(12):1182-1188.
- Suh KS, Goy A. 2008. Bortezomib in mantle cell lymphoma. *Future Oncol* 4(2):149-168.
- Swerdlow S, Williams M. 2002. From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades. *Human pathology* 33(1):7-20.
- Tamburini J, Chapuis N, Bardet V and others. 2008. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood* 111(1):379-382.
- Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. 2009. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* 9(5):324-337.
- Tsang CK, Qi H, Liu LF and others. 2007. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today* 12(3-4):112-124.
- Webb J. 1963. Effect of more than one inhibitor. *Enzyme and metabolic inhibitors* 1:66-79.
- Weissinger F, Kreipe H, Wilhelm M. 1997. Non-Hodgkin-Lymphome. *Der Internist* 38(11):1131-1142.
- Weniger MA, Wiestner A. 2011. Molecular targeted approaches in mantle cell lymphoma. *Semin Hematol* 48(3):214-226.
- Witzig TE. 2005. Current treatment approaches for mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 23(26):6409-6414.
- Witzig TE, Kaufmann SH. 2006. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin pathway in hematologic malignancies. *Curr Treat Options Oncol* 7(4):285-294.



Yee KW, Zeng Z, Konopleva M and others. 2006. Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 12(17):5165-5173.

Zucca E, Roggero E, Pinotti G and others. 1995. Patterns of survival in mantle cell lymphoma. *Ann Oncol* 6(3):257-262.

### 10 Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Martin Dreyling, danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor durchgeführt haben zu dürfen.

Meinem Betreuer, Dr. biol. Marc Weinkauff, danke ich sowohl für die Hilfe bei der Einarbeitung in die molekularbiologische Forschung als auch für die Weitergabe seiner langjährigen wissenschaftlichen Erfahrungen in den schwierigen Phasen meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern im Labor von Herrn Prof. Dr. med. Martin Dreyling für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft danken, insbesondere Frau Dr. Grit Hutter, Frau Yvonne Zimmermann und Herrn Tobias Weiglein.

Karlheinz Pulzer danke ich für die Geduld und hervorragende Unterstützung in allen Phasen der Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich besonders meinen lieben Eltern danken, die mir dieses Studium erst ermöglicht haben und mich jederzeit unterstützt, gefördert und motiviert haben.