

---

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

**Molekular gezielte Therapie des Mantelzelllymphoms -  
*In Vitro* Wirksamkeit von Flavopiridol  
in Mono- und Kombinationstherapie**

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

vorgelegt von  
Tobias Weiglein  
aus  
München

2012

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Dreyling  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Joachim-Ulrich Walther  
Priv. Doz. Dr. Christian Straka

Mitbetreuung durch den  
Promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Marcus Weinkauf

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

Tag der mündlichen Prüfung: 01.03.2012

---

Für meine Familie

---

---

## **Danksagung**

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Martin Dreyling für die Bereitstellung seines Labors für meine Experimente, das interessante Thema und seine uneingeschränkte und immer freundliche Unterstützung danken.

Ganz besonders möchte ich auch die Geduld und intensive Betreuung durch Herrn Dr. Marc Weinkauff hervorheben und mich an dieser Stelle nochmals für seinen Einsatz bedanken, ebenso bin ich bei den restlichen Mitglieder der Arbeitsgruppe die mich während meiner Zeit begleitet haben, Malte Rieken, Grit Hutter, Yvonne Zimmermann, Anagha Borwankar, Marion Puimatto und Alina Postnikova, für die Hilfe und interessante Zeit zu großen Dank verpflichtet.

Diese Arbeit widme ich meiner lieben Familie, meinen Eltern Katharina und Wolfgang Weiglein und meinem Bruder Jakob. Ich danke euch für eure immer währende, uneingeschränkte Unterstützung in harmonischen und in stressigen Zeiten, eure unerschütterliche Geduld und Liebe sowie für eure große Kraft.

---

**Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:**

|          |  |
|----------|--|
| (e. ...) | aus dem Englischen   |
| ATM      | Ataxie-Teleangiektasie-Mutation  |
| ATP      | Adenosin-tri-Phosphat  |
| B-NHL    | B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom   |
| BCL-1    | Breakage cluster of Lymphoma 1   |
| BCL-2    | Breakage cluster of Lymphoma 2   |
| BM       | Bendamustin  |
| BRCA1    | Breast Cancer 1  |
| BR       | Bendamustin, Rituximab   |
| CCND1    | Cyclin D1 Genlocus   |
| CI       | Kombinatorischer Index (e. combinatory index)                              |
| CLL      | Chronisch lymphatische Leukämie  |
| CD       | Complimentary deterring (region)   |
| CDK      | Cyclin abhängige Kinase (e. cyclin dependent kinase)                       |
| CDKI     | Cyclin abhängige Kinase Inhibitor (e. cyclin dependent kinase inhibitor)   |
| CHOP     | Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin, Prednison                |
| CHK      | Checkpoint Kinase  |
| CR       | Komplettremission (e. complete remission)                                  |
| DNA      | Desoxyribonukleinsäure   |
| DPBS     | Dulbecco's Phosphate Buffered Saline                                       |
| FACS     | Durchflusszytometrie (e. Fluorescence activated cell sorter)               |
| FBS      | fötales Rinderserum (e. fetal bovine serum)                                |
| FCM      | Fludarabin, Cyclophosphamid, Mitoxantron                                   |
| FISH     | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung   |
| FP       | Flavopiridol   |
| Gy       | Gray   |
| HyperVAD | Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin, Decadron, Cytarabin, Methotrexat |
| IC       | Inhibitorische Konzentration (e. inhibitory concentration)                 |
| IgH      | Immunoglobulin Heavy Chain   |
| IVCLSP   | In Vitro Cell Line Screening Project                                       |
| Kb       | Kilobasen  |
| LDH      | Laktat-Dehydrogenase   |
| MCL      | Mantelzelllymphom  |
| MCL-1/2  | Myeloid cell leukaemia sequence 1/2  |
| MDM-2    | Murine-double-Minute-2   |
| mRNA     | Messenger Ribonukleinsäure   |
| mTOR     | Mammalian Target of Rapamycin  |

## Inhaltsübersicht

---

|          |   |
|----------|---|
| MIPI     | Mantle-cell lymphoma international prognostic index                   |
| NSCLC    | Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom (e. non small cell lung carcinoma) |
| NBS      | Nijmegen breakage syndrome  |
| NCI      | National Cancer Institute   |
| NHL      | Non-Hodgkin-Lymphom   |
| OS       | Gesamtüberleben (e. overall survival)                                 |
| ORR      | Gesamtansprechrte (e. overall response rate)                          |
| PCR      | Polymerase-Ketten-Reaktion (e. polymerase chain reaction)             |
| PFS      | progressionsfreies Überleben (e. progression free survival)           |
| PRAD-1   | Parathyroid-Adenomatosis-1  |
| PS       | Membranphospholipid Phosphatidylserin                                 |
| PVDF     | Polyvinylidenfluorid  |
| R        | Rituximab   |
| REAL     | Revised European American Lymphoma                                    |
| RNA      | Ribonukleinsäure  |
| SCT      | Stammzelltransplantation (e. stem cell transplantation)               |
| SDS-PAGE | Sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide-gel-electrophoresis             |
| STIL     | Studiengruppe indolente Lymphome                                      |
| TBS      | Tris-buffered-saline  |
| VEGF     | Vascular Endothelial Growth Factor                                    |
| VF       | Vergößerungsfeld  |
| WHO      | Welt gesundheits Organisation (e. World Health Organisation)          |
| XIAP     | X-linked inhibitor of apoptosis                                       |



|   |    |
|---|----|
| Verzeichnis der Abkürzungen.....  | 7  |
| 1. Das Mantelzelllymphom .....  | 11 |
| 1.1 Definition .....  | 11 |
| 1.2 Morphologie .....   | 11 |
| 1.3 Immunotypisierung .....   | 12 |
| 1.4 Zytogenetik und Molekulargenetik.....                                 | 13 |
| 1.5 Epidemiologie, Klinik und Verlauf.....                                | 16 |
| 1.6 Therapie .....  | 17 |
| 2 Molekular gezielte Therapieansätze.....                                 | 21 |
| 2.1 Flavopiridol.....   | 21 |
| 2.2 Bendamustin .....   | 25 |
| 3 Zielsetzungen dieser Arbeit.....  | 28 |
| 4 Material und Methoden.....  | 30 |
| 4.1 Zellkultur.....   | 30 |
| 4.1.1 Charakterisierung der Zelllinien.....                               | 30 |
| 4.1.2 Bedingungen der Zellkultur .....                                    | 31 |
| 4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien.....                         | 31 |
| 4.2 Methoden der Zellquantifizierung .....                                | 32 |
| 4.2.1 Trypanblau-Ausschlusstest .....                                     | 32 |
| 4.2.2 Vi-Cell .....   | 32 |
| 4.2.3 Errechnung der Fraction of Product .....                            | 33 |
| 4.3 WST-1 Proliferationsassay.....  | 34 |
| 4.4 Kombinatorische Indizes nach Chou und Talalay.....                    | 35 |
| 4.5 Apoptoseanalyse mit 7AAD/AnnexinV FACS.....                           | 37 |
| 4.6 Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid Färbung .....                    | 38 |
| 4.7 Western-Blot - Analysen.....  | 39 |
| 4.8 Material .....  | 41 |
| 4.8.1 Lösungen und Puffer .....   | 41 |
| 4.8.2 Inhibitoren und Zytostatika .....                                   | 41 |
| 4.8.3 Antikörper .....  | 41 |
| 4.8.4 Softwareprogramme.....  | 42 |
| 4.8.5 Geräte .....  | 42 |
| 5 Ergebnisse .....  | 43 |
| 5.1 Flavopiridol.....   | 43 |
| 5.1.1 Dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung .....                | 43 |
| 5.1.2 IC <sub>50</sub> <sup>24h</sup> - Werte der Zelllinien (WST-1)..... | 47 |
| 5.1.3 Apoptoseinduktion durch Flavopiridol.....                           | 48 |
| 5.1.4 Auswirkungen von Flavopiridol auf den Zellzyklus .....              | 49 |
| 5.1.4.1 Änderungen im Zellzyklusprofil nach Flavopiridol.....             | 49 |
| 5.1.4.2 Dosis- und zeitabhängiger G1/S -und G2/M Arrest .....             | 50 |
| 5.1.5 Auswirkungen von Flavopiridol auf CDK Expression.....               | 54 |

## Inhaltsübersicht

---

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 5.2   | Bendamustin .....   | 56 |
| 5.2.1 | Dosis- und zeitabhängige Verringerung der Zellzahl.....             | 56 |
| 5.2.2 | IC <sub>50</sub> <sup>24h</sup> - Werte der Zelllinien (WST-1)..... | 59 |
| 5.3   | WST-1 Kombinationsassays .....                                      | 61 |
| 5.3.1 | Flavopiridol und Bortezomib .....                                   | 61 |
| 5.3.2 | Flavopiridol und Bendamustin .....                                  | 61 |
| 5.4   | Vi-Cell Kombinationsassays .....                                    | 63 |
| 6     | Diskussion.....   | 66 |
| 7     | Zusammenfassung:.....   | 77 |
| 8     | Literaturverzeichnis .....  | 79 |

# 1 Das Mantelzelllymphom

## 1.1 Definition

„Mantelzelllymphom“ (MCL) ist die seit 1992 verwendete Bezeichnung für eine lymphoproliferative Erkrankung, die von einer Gruppe naiver B-Zellen ausgeht, welche das Keimzentrum noch nicht durchlaufen haben (*Banks, 1992*). Zuvor wurde diese Erkrankung in den 70er Jahren im Rahmen der Kiel-Klassifikation als zentrozytisches Lymphom (*Lennert, 1975*) bezeichnet und in der amerikanischen Literatur als lymphozytisches Lymphom mit intermediärer Differenzierung subsummiert (*Berard und Dorfmann, 1974*). Da die Ähnlichkeit der Lymphomzellen zu den Zentrozyten des Keimzentrums sehr groß ist, wurde zunächst fälschlicherweise angenommen, dass es sich um Keimzentrumzellen handelt (*Lennert, 1975*). Aufgrund der topologischen Verteilung alkalischer Phosphatase-positiver Tumorzellen konnte jedoch einige Jahre später eine Beziehung zu Zellen der Mantelzone vermutet werden und der Follikelmantel als Ursprungsort der Zellen definiert werden (*Nanba, 1977*).

Wegen der sehr variablen Morphologie ist die Diagnose des Mantelzelllymphoms schwierig und erfordert regelmäßige Referenzpathologien. Erst seit Einführung der REAL-Klassifikation und der auf dieser basierenden WHO-Klassifikation gilt das Mantelzelllymphom seit 2001 als eigenständige maligne Entität (*Jaffe, 2001, Harris, 2000*). Ausschlaggebend für die aktuelle Anerkennung des Mantelzelllymphoms als eigener Phänotyp ist die molekularbiologisch nachweisbare pathognomonische chromosomale Translokation  $t(11; 14)(q13; q32)$  und die dadurch resultierende charakteristische Überexpression von Cyclin D1 (*Bertoni, 2006*). Diese wichtigen Erkenntnisse aus der Molekularbiologie sind heute zielführend in der Diagnostik und dem besseren Verständnis dieses Malignoms.

## 1.2 Morphologie

Es werden vom Pathologen zwei morphologische Varianten des MCL unterschieden. Zum einen der klassische Typ, charakterisiert durch monotone Proliferation von kleinen bis mittelgroßen zytoplasmaarmen Lymphozyten mit unregelmäßigen, oft ge-

kerbten Zellkern und unscheinbaren Nucleoli. Aufgrund dieser Morphologie kann es oft schwierig sein, diese MCL-Variante verlässlich von anderen Lymphoproliferativen Erkrankungen, z.B. dem Marginalzonen-Lymphom, dem folliculären Lymphom oder aber der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) differentialdiagnostisch abzugrenzen (*Weisenburger, 1996*).

Die andere Form des MCL ist die blastoide Variante. Diese Form macht weniger als 10% aller neu diagnostizierten Fälle aus und zeichnet sich durch einen klinisch aggressiveren Verlauf aus als das klassische MCL, mit einem medianen Überleben von 14 Monaten nach Diagnosestellung im Vergleich zu 54 bei der klassischen Variante (*Bernard, 2001, Bosch, 1998*). Morphologisch imponiert das blastoide MCL durch große, pleomorphe Zellen mit fein verteiltem Chromatin und Nucleoli und einem im Vergleich zum klassischen Subtyp erhöhtem mitotischem Index. Diese Zellen weisen eine große Ähnlichkeit mit den großzelligen Lymphomen auf (*Campo, 1999*). Das spezifische Wachstumsmuster der malignen Infiltrate des MCL (diffus, nodulär) wurden in der Literatur als prognostische Faktoren beschrieben und gehen mit unterschiedlichen klinischen Verläufen einher; so wurde ein medianes Überleben von 16 Monaten bei diffusem Wachstum beobachtet, im Gegensatz zu 50 Monaten bei nodulärem Wachstum (*Majlis, 1997*).

### **1.3 Immunotypisierung**

Das Mantelzelllymphom zeigt einen charakteristischen Phänotyp reifer B-Zellen (*Swerdlow, 1983*). Die Zellen exprimieren die Pan-B-Zell-Marker CD20, CD22, CD24, CD43, CD79a und HLA-DR. Typischerweise negativ sind die Lymphomzellen für CD10, CD23 und den Keimzentrumsmarker BCL-6, was eine wichtige Abgrenzung zum folliculären Lymphom darstellt (*Bertoni, 2004; Salaverria, 2006*). Ein weiteres wichtiges Charakteristikum des MCL stellt die Koexpression des T-Zell-assoziierten Antigens CD5 in nahezu allen Fällen sowie die fehlende CD23 Expression dar, wodurch sich das MCL von der CLL unterscheiden lässt (*Williams, 2005, Korz, 2002*). Allerdings können Einzelfälle eine Negativität für CD5 und die Expression von CD10, BCL-6 oder T-Zell Markern CD8 oder CD7 aufweisen (*Campo, 1999, Swerdlow, 2002*). Zudem ist eine IgM- und häufig auch eine IgD-Expression vorhanden (*Bertoni, 2004*). Im Gegensatz zu normalen B-Zellen, mit überwiegender Expression von Igk-Leichtketten, exprimieren Mantelzelllymphome häufig Igλ-Leichtketten (*Swerdlow,*

1983). Das genetische Kennzeichen des MCL ist die chromosomale Translokation  $t(11; 14)(q13; q32)$ , die in nahezu allen MCL Fällen nachgewiesen werden kann (Campo, 1999). Diese stark gesteigerte Expression ist ein für das MCL charakteristisches Phänomen, das wegweisend ist für die Diagnose. Methode der Wahl zur Detektion dieser Translokation ist die Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (Levy, 1999, Yatabe, 2000).

## 1.4 Zytogenetik und Molekulargenetik

Wie bereits erwähnt ist das zentrale molekulare Ereignis beim MCL die chromosomale Translokation  $t(11; 14)(q13; q32)$ . Diese reziproke Translokation betrifft zum einen den kodierenden Locus der schweren Immunglobulinketten (IgH) auf Chromosom 14, sowie eine Region auf der chromosomalen Bande 11q13, die als *BCL-1* (breakage cluster of Lymphoma 1) bezeichnet wurde, stellvertretend für ein in dieser Region identifiziertes Onkogen (Rosenberg, 1991, Withers, 1991). Initial *PRAD1* (parathyroid adenomatosis 1) genannt, da erstmals bei Nebenschilddrüsenadenomen beschrieben (Motokura, 1991), wurde dieses Gen im folgenden offiziell als *CCND1* bezeichnet. Durch diese Translokation wird der für Cyclin D1 codierende *BCL-1* Genlocus durch die Kopplung an den IgH Promoter unter dessen Kontrolle gestellt. Das dadurch resultierende genetische Rearrangement des *CCND1* Gens führt zu einer konstitutionellen Cyclin-D1-Überexpression in den Zellen. Dieses Cyclin Typ D spielt eine enorm wichtige Rolle in der Steuerung des Zellzyklus (Hunter, 1994) und wird normalerweise nicht in normalen B-Lymphozyten exprimiert (Rosenberg, 1991).

Cyclin D1 wird in zwei Isoformen transkribiert, ein 1.5 und ein 4.5 Kilobasen (kb) langes Transkript (de Boer, 1995). Beide Transkripte enthalten den gesamten kodierenden Bereich des Gens und unterscheiden sich nur in der Länge ihrer 3' Region, wobei die 4.5 kb Isoform dort ein AUUUA-Segment beinhaltet, welches sich negativ auf die Stabilität der *CCND1*-mRNA auswirkt (Rimokh, 1994). Daraus folgend ist eine hohe Expression der kurzen Isoform mit höheren intrazellulären Cyclin D1 mRNA- und Protein-Konzentrationen verbunden und mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Bosch, 1994, de Boer, 1995).

Cyclin D1 ist ein Zellzyklus-Regulator von entscheidender Bedeutung; es bildet zusammen mit den Cyclin abhängigen Kinasen (CDK) einen enzymatischen

Komplex, der einen Übergang der Zelle von der G1 in die S-Phase bewirkt. Dies wird durch verschiedene zelluläre Mechanismen bewerkstelligt. Einerseits führt der pathologische Anstieg der intrazellulären Konzentration von Cyclin D1/CDK4- und 6-Komplexen zur direkten Phosphorylierung (Aktivierung) des Retinoblastom-Proteins (Rb), wodurch Rb seine hemmende Wirkung auf den Zellzyklus verliert (*Hunter, 1994; Sherr 1996*). Andererseits unterliegt Cyclin D1/CDK4 und 6 der Kontrolle einer Reihe von inhibitorischen Tumorsuppressoren wie p53, p21, und den Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren (CKI), z.B. p15 (*INK4b, MTS2*), p16 (*INK4a, MTS1, CDKN2*), p18 (*INK4c*), p19 (*INK4d*) und p27KIP (*CDKN1B*) (*Hirama und Koeffler, 1995*). Da Cyclin D1/CDK kompetitiv mit Cyclin E/CDK-Komplexen um eine Bindung mit Inhibitoren wie p27KIP oder p21 konkurriert und somit auch Rb verstärkt phosphoryliert wird, führen hohe Cyclin D1-Konzentrationen auch auf diesen Weg zu einem Eintritt der Zellen in die S-Phase (*Bertoni, 2006*). Der Grad der Cyclin D1-Expression steht in direkter Korrelation zum beobachteten Tumorwachstum (*Rosenwald, 2003*).

Obwohl die Cyclin D1-Überexpression das genetische Kennzeichen des MCL ist, sind auch Fälle von Cyclin D1-negativen MCL beschrieben worden. Klinisch unterscheiden sich die Cyclin D1-negativen Fälle nicht von den Cyclin D1-positiven Fällen und weisen dasselbe für das MCL charakteristische Muster im Genexpressions-Mikroarray auf. Als Kompensation zu der fehlenden Cyclin D1-Überexpression wurde eine Hochregulation von Cyclin D2 und D3 nachgewiesen, welche in den Cyclin D1-negativen Tumoren nachweisbar ist (*Fu, 2005*).

Zusätzlich zur Überexpression von Cyclin D1 sind auch andere Zellzyklus-Regulatoren beim MCL verändert. Insbesondere wurde eine zusätzliche homozygote Deletion der Chromosomen-Bande 9p21 in einer Vielzahl von besonders aggressiven MCL-Fällen beobachtet (*Gronbaek, 1998, Dreyling, 1997*). Hierbei verliert der bereits erwähnte CKI, p16, seine Funktion. p16 inhibiert CDK4 und CDK6 und enthält das Rb Protein somit in seiner aktiven, antiproliferativen Funktion aktiv (*Serrano, 1993*). Deletion von p16 (*INK4a*) und simultane Cyclin D1 beeinflussen denselben Signalpfad, allerdings codiert der Genort *INK4a/ARF* auch für ein weiteres Transkript (*Fernandez, 2005*). Neben p16 (*INK4a*) codiert der Genort *INK4a/ARF* auch für ein weiteres Transkript, p14. Die Hauptfunktion von p14 ist die Stabilisierung von p53 durch Verhinderung der proteasomalen Degradation durch mouse-double-minute (*MDM-2*) und somit einer intrazellulären Verringerung dieses wichtigen Tumor-suppressiven Transkriptionsfaktors (*Pomerantz, 1998*).

Nachdem in MCL, wie auch in anderen B-Zell-Lymphomen, Deletionen des *INK4a/ARF* Genorts gewöhnlich sowohl p16 (*INK4a*) als auch p14 (*ARF*) betreffen, führt eine Inaktivierung zu einer gleichzeitigen Hemmung von negativer Zellzyklusregulation und des p53-Signaltransduktionsweges. Deletionen des *INK4a/ARF*-Genlokus wird in etwa 20% aller MCL Fälle nachgewiesen (*Rosenwald, 2003*). In besonders aggressiven blastoiden Varianten des MCL konnte eine „upstream“ gelegene genetische Veränderung beschrieben werden, die Amplifikation des *CDK4* Gens. Diese Mutation repräsentiert einen weiteren alternativen Mechanismus der Dysregulation durch Störung des G1/S-Phase Kontrollpunktes in der Pathogenese des MCL.

Der zweite Mechanismus in der Pathogenese des MCL ist eine fehlerhafte Funktion des zellulären DNA-Reparaturmechanismus. Nach der Translokation t(11; 14) sind die am häufigsten beobachteten zytogenetischen Veränderungen Deletionen in der chromosomalen Region 11q22-23. In dieser Region ist das Ataxia-telangiectasia-mutations-Gen (*ATM*) zu finden (*Monni, 1998, Stilgenbauer, 1999*). *ATM* kodiert für eine Phosphoproteinkinase welche zur Phosphotidyl-Inositol-3-Kinase-Familie gehört und eine entscheidende Rolle bei der zellulären Antwort auf DNA-Schäden spielt. Es konnte in bis zu 70% aller MCL Fälle eine *ATM*-Mutation in Form einer Deletion oder Verkürzung nachgewiesen werden (*Camacho, 2002, Schaffner, 2000, Zhou, 2000*). Das *ATM* Protein ermöglicht die p53-Aktivierung nach DNA-Schäden und kontrolliert zusätzlich die Phosphorylierung von wichtigen Effektor-Proteinen (*MDM2, BRCA1* (Breast cancer 1), *CHK1, CHK2* (checkpoint kinase 1, 2) und *NBS1* (Nijmegen breakage syndrome 1) des G1 oder G2-Arrest und einer verminderten DNA-Synthese. *CHK1* und *CHK2* sind Kinasen, die nach DNA-Schädigung eine DNA-Replikation verhindern und einen Zellzyklusarrest induzieren (*Zhou, 2000*). In einem Teil von MCL-Fällen konnten Alterationen im Bereich des *CHK2*-Genlokus nachgewiesen werden, in seltenen Fällen von MCL auch ein verminderter Gehalt an *CHK1*-Protein (*Hangaishi, 2002, Tort, 2005*). *ATM*-Mutationen können sowohl in der klassischen als auch in der blastoiden Variante des MCL vorkommen und haben keinen nachweislichen Zusammenhang mit der Proliferationsrate oder dem klinischen Verlauf der Erkrankung. Dies deutet darauf hin, dass die *ATM*-Alterationen zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorgenese eine Rolle spielen oder zumindest eine Prädisposition für die Entstehung des MCL darstellen (*Rosenwald, 2003*).

Ebenso ist p53 ein häufiges Ziel von genetischen Alterationen beim MCL. Wie bereits

erwähnt, fungiert p53 als wichtiger Transkriptionsfaktor, dessen Hochregulation als Apoptose-vermittelnder und anti-proliferativer Mediator fungiert. p53-inaktivierende Mutationen werden selten im klassischen MCL beobachtet, jedoch in etwa 30% der blastoiden Variante nachgewiesen, und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert (*Louie, 1995, Greiner, 1996, Hernandez 1996*).

Die Pathogenese des MCL zeichnet sich also durch Mutationen verschiedener Elemente sowohl der Zellzyklus-Regulation als auch der DNA-Reparatur aus.

## 1.5 Epidemiologie, Klinik und Verlauf

Statistisch repräsentiert das Mantelzelllymphom ca. 6-8% aller Non-Hodgkin-Lymphome bzw. ca. 2 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr in Nordamerika und Europa und gehört somit zu den Lymphomen mittlerer Häufigkeit (*Fischer, 1996, Argatoff, 1997*). Das MCL hat die schlechteste Langzeitprognose aller B-Zell-Lymphome und weist ein medianes Überleben von 3 Jahren mit nur 10-15% Langzeitüberlebenden auf. Aktuelle Untersuchungen berichten jedoch von einer Überlebensrate von 5 Jahren (*Hermann, 2009*). Der mediane Altersgipfel bei Erstdiagnose liegt je nach Studie zwischen 60 und 70 Jahren. Es besteht eine klare männliche Prädominanz mit einer Geschlechterverteilung von mindestens 3:1 (*Swerdlow und Williams 2002, Weisenburger, 1982*). Circa 80% der Patienten weisen bei Diagnosestellung bereits ein fortgeschrittenes Stadium (Stadium III-IV nach Ann Arbor) mit generalisierter Lymphadenopathie und/oder extranodalen Befall auf (*Bosch, 1998*). Letzteres ist bei MCL-Patienten mit bis zu 90% besonders häufig: Etwa 80% der Patienten weisen initial eine Infiltration des Knochenmarks auf, 20-30% der Fälle zeigen einen Befall des peripheren Blutes im Rahmen einer leukämischen Aussaat (*Wong, 1999*). Andere häufig befallene Lokalitäten des Körpers sind Organe mit einer engen Beziehung zu lymphatischem Gewebe bzw. Funktionen; so ist Milz (55%), Leber (35%), Gastrointestinaltrakt (15%) und der Waldeyer'scher Rachenring (10%) mit am häufigsten betroffen.

Selten befällt das MCL auch andere extranodale Organe wie das zentrale Nervensystem, die Speicheldrüsen, Pleura, Haut, Lunge oder Orbita (*Campo, 1999*). In 10-15% findet sich nur ein extranodaler Befall ohne Lymphknotenbeteiligung und in 30-50% sind mehr als zwei extranodale Organe befallen. Laborchemisch finden sich in etwa 50% der Patienten eine Anämie und erhöhte Serumspiegel von



Laktatdehydrogenase (LDH) und  $\beta$ 2-Mikroglobulin, wohingegen monoklonale Immunglobuline sich nur in 10-30% der Fälle nachweisen lassen (*Bosch, 1998*).

2008 etablierten Hoster et al. einen spezifischen Prognoseindex für das MCL (MIPI, mantle-cell lymphoma international prognostic index). Hierbei erwiesen sich 4 untersuchte Parameter als besonders wichtig für eine individuelle Risikostratifizierung und Prognose (Alter, Allgemeinzustand, LDH- und Leukozyten-Werte) und erlaubt risiko-adaptierte Therapieentscheidungen für Patienten (Hoster, 2008).

Ein weiterer wichtiger prognostischer Parameter stellt die Proliferationsrate bzw. eine Expression proliferations-assoziiierter Gene dar, insbesondere von Ki-67 (*Tiemann, 2005*). In einer multivariaten Analyse konnten Dreyling et al. zeigen, dass die Proliferationsrate morphologischen Prognosefaktoren deutlich überlegen ist (*Dreyling, 2002*). Bei MCL Patienten mit  $>2,5$  Mitosen/VF konnte ein nur 24 monatiges medianes Überleben verzeichnet werden, wohingegen Betroffene mit  $<2,5$  Mitosen/VF ein medianes Überleben von 50 Monaten zeigten (*Bosch, 1998*). Rosenwald et al. konnten 2003 in einer RNA-Mikroarray-Studie diese Ergebnisse bestätigen

Die Proliferationsrate bildet die gemeinsame Endstrecke vieler pathologischer Alterationen und stellt somit den wichtigsten Prognosefaktor für das MCL (Rosenwald, 2003).

## 1.6 Therapie

Das MCL zeichnet sich durch eine infauste Langzeitprognose aus. Charakteristisch für den Verlauf dieser Erkrankung ist zunächst eine hohe Rate an Gesamtansprechen (ORR) auf initiale Therapie von 70 bis 80% und komplette Remissionen (CR) in bis zu 20%, unabhängig vom applizierten Regime, gefolgt von einem relativ kurzen progressionsfreien Intervall bis zum Voranschreiten der Erkrankung. Das geringe mediane Gesamtüberleben (OS) von 3 bis 4 Jahren beim MCL ist in retrospektiven Analysen verglichen worden und stellt die schlechteste Langzeitprognose aller B-Zell-Lymphomtypen dar (*Witzig, 2005*).

Trotz des stetigen Wissenszuwachses über die Pathogenese des MCL in den letzten Jahren bleibt die Behandlung äußerst schwierig. Die Therapie des MCL richtet sich nach dem jeweiligen Stadium der Erkrankung. In den seltenen, im Frühstadium diagnostizierten Fällen (Ann Arbor I und II, 10 – 15 % aller Fälle) besteht die

empfohlene Behandlung aus einer alleinigen Strahlentherapie mit 30-40 Gy, wobei lang anhaltende Remissionen beobachtet werden konnten (*Hiddemann und Dreyling, 2003*). Der überwiegende Anteil der neu diagnostizierten MCL-Fälle befinden sich jedoch bereits in den fortgeschrittenen Ann Arbor-Stadien III und IV. Im Allgemeinen zeigen hier aggressivere Konzepte hohe Ansprechraten und verbessern das progressionsfreie Überleben (PFS), dennoch ist das MCL in den fortgeschrittenen Stadien durch keine der bisher bekannten Therapien heilbar (*Brody, 2006*).

Die bis dato verwendeten Chemotherapie-Regime lassen sich in 3 verschiedene Gruppen einteilen: Schemata die Anthrazykline enthalten (CHOP: Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison), intensiviert Kombinationstherapie HyperCVAD (Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin, Decadron, Cytarabin und Methotrexat), und auf Purin-Analoga basierende Schemata wie FCM (Fludarabin, Cyclophosphamid und Mitoxantron). Jedes dieser Regime führt zu Ansprechraten von 60 bis 80% und in 20 bis 40% zu Komplettremissionen (*Witzig, 2005*). In den fortgeschrittenen Stadien III-IV ist CHOP das Standardregime zur Behandlung des MCL, da in einer retrospektiven Studie eine Verlängerung des Gesamtüberlebens (OS) nach anthrazyklinhaltiger Chemotherapie beobachtet wurde (*Zucca, 1995*). Durch den Einsatz von Rituximab®, einem monoklonalen, spezifischen anti CD20-Antikörper, in Kombination mit dem konventionellen CHOP Schemata, konnten signifikant verbesserte Ansprechraten (ORR) und Komplettremissionen (CR) sowie eine Verlängerung des PFS von R-CHOP gegenüber einer alleinigen Chemotherapie beobachtet werden. Somit stellt Rituximab in der Initialtherapie des MCL eine wichtige Verbesserung dar (*Lenz, 2005*). In einer kleinen Studie mit 40 MCL-Fällen konnte ebenfalls eine Verlängerung des OS durch Hinzunahme von Rituximab zu einem Fludarabin-haltigen Protokoll nachgewiesen werden (FCM) (*Forstpointner, 2004*). Hier scheint sich der synergistische Effekt beider Substanzen, der bereits *in vitro* beschrieben wurde, *in vivo* zu bestätigen (*Di Gaetano, 2001*).

Eine weitere Innovation, ebenfalls auf monoklonalen Antikörpern basierend, ist die Radioimmunotherapie mit Yttrium <sup>90</sup> Y Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin®) oder Iod <sup>131</sup> I Tositumomab (Bexxar®). Bei diesem Therapieansatz wird ein beta-Strahler an einem spezifischen monoklonalen Antikörper gekoppelt und somit eine selektive Bestrahlung in unmittelbarer Nähe des Tumors ermöglicht. Aktuelle Studien mit kleinen Fallzahlen von rezidierten MCL zeigen viel versprechende Ergebnisse mit einem PFS von 63% und einem OS von über 90% nach drei Jahren (*Gopal, 2002*).

Der therapeutische Stellenwert der Radioimmunotherapie wird erst in Zukunft vollends zu bewerten sein.

Eine weitere Therapieoption, für Patienten unter 65 Jahren, ist eine myeloablative Therapie mit anschließender autologen Stammzelltransplantation (SCT). Eine Studie des europäischen MCL-Netzwerks konnte einen Überlebensvorteil dieser Methode im Vergleich zur alleinigen Interferon alpha Konsolidierungstherapie belegen. Für das anhaltende PFS nach autologer SCT scheint vor allem der frühe Transplantationszeitpunkt als primäre Konsolidierung ausschlaggebend zu sein. Patienten in CR haben eine dreifach bessere OS nach autologer SCT im Vergleich zu Rezidiv-Patienten (*Dreyling, 2005*). Dennoch rezidivieren die meisten Patienten im weiteren Verlauf nach autologer SCT, daher stellt die autologe SCT keinen kurativen Ansatz dar. Eine weitere therapeutische Option bietet die allogene SCT. Da die allogene SCT aufgrund des Graft-versus-Leukemia Effekts beim MCL ein krankheitsfreies 4-Jahresüberleben von bis zu 80% erreichen kann, stellt dieser aggressivere Ansatz die einzige kurative Methode bei der Behandlung des fortgeschrittenen MCL dar (*Dreyling, 2007, Khouri, 2003*). Allerdings ist die allogene SCT besonders bei älteren, zum Teil stark vorbehandelten Patienten mit schweren therapieassoziierten Nebenwirkungen, insbesondere Infektionen, verbunden. Dadurch weist die allogene SCT eine sehr hohe therapieassoziierte Mortalität auf und unterliegt somit einer strengen Indikationsprüfung (*Robinson, 2002*). Da das MCL vorwiegend in älteren Patienten auftritt, die für eine myeloablative Therapie nicht geeignet sind, wird seit kurzem eine dosisreduzierte Konditionierung, gefolgt von allogener SCT, eingesetzt (*Khouri, 2003*). Betrachtet man zusammenfassend die Therapie des MCL über die letzten Jahrzehnte, sind zwar große Fortschritte bezüglich der Anzahl an CR und der Therapieverträglichkeit zu verzeichnen gewesen, leider wurden aber keine dauerhaften Heilungen erzielt (*Press, 2002*).

Durch den enormen Wissenszuwachs über die molekularbiologische Pathogenese des MCL wurden über die letzten Jahre hinweg eine Reihe neuer, biologisch aktiver Substanzen entwickelt und auf ihre Wirksamkeit *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Hierbei handelt es sich um gezielte molekulare Therapien, die im Gegensatz zu konventionellen Chemotherapien nicht alle rasch teilenden Zellen unspezifisch schädigen, sondern durch gezielte Eingriffe in die alterierten molekularen Mechanismen einen antineoplastischen Effekt erzielen. Idealerweise sind die Zielstrukturen dieser Substanzen Moleküle, deren Vorkommen bzw. Expression möglichst spe-

zifisch für die Tumorzelle sind und somit normales Körpergewebe kaum geschädigt wird. Zu diesen neuen Stoffen in Erprobung zählen unter anderen Bortezomib (Velcade<sup>®</sup>), ein potenter Proteasom Inhibitor, mTOR-Kinase Inhibitoren wie Rapamycin (Sirolimus<sup>®</sup>), Temsirolimus<sup>®</sup> oder Rad001 (Everolimus<sup>®</sup>), Immunmodulatoren wie Thalidomid<sup>®</sup> und Lenalidomid<sup>®</sup> und CDK Inhibitoren wie Flavopiridol (*Dreyling, 2008*).

Die Wirksamkeit von Temsirolimus wurde in einer Phase II Studie an Patienten mit therapierefraktärem MCL untersucht und erreichte ein ORR von 40% mit einem mittleren PFS von 6,5 Monaten (*Witzig, 2005*). Auch Bortezomib ist ein viel versprechender molekularer Ansatz und erreicht in rezidierten MCL ORR von bis zu 45%, jedoch wurden CR nur selten und eine relative kurze PFS mit 6,2 Monaten beobachtet (*Fischer, 2005*).

Die Kombination von Thalidomid und Rituximab führt bei Niedrigrisikopatienten in 31% zu einer CR sowie einem medianen PFS von 20,4 Monaten und einem 3 Jahresüberleben von 75% (*Kaufmann, 2004*).

Diese Kenntnisse zeigen auf, dass molekulare Therapeutika ihren optimalen Einsatz als Kombinationspartner mit bereits etablierten Therapieformen erfahren und in Zukunft zu einer echten Verbesserung in der Behandlung des MCL führen könnten.

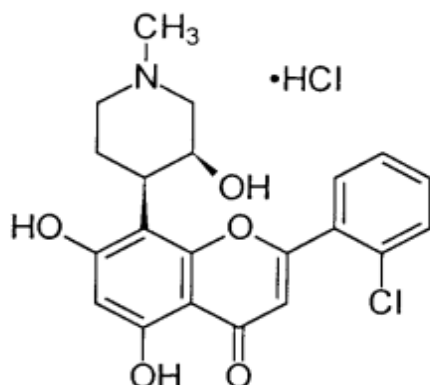
Zwei weitere interessante Stoffe für die Therapie des MCL sind Bendamustin, ein außerhalb Deutschlands noch wenig bekanntes Chemotherapeutikum, und Flavopiridol, ein CDK Inhibitor. Auf diese Stoffe wird jedoch noch im einzelnen genauer eingegangen.

## 2 Molekulare therapeutische Ansätze

### 2.1 Flavopiridol

Flavopiridol (Alvocidib, (-)-cis-2-chlorophenyl-5,7-dihydroxy-8-4(-3hydroxy-1-methyl)piperidinyl-4H-1-benzopyran-4-ein Hydrochlorid), auch als L86-8275 bezeichnet, ist ein semisynthetisches Flavon. Flavone sind gelbe Pflanzenfarbstoffe, die als Derivate des Flavons zur Klasse der Flavonoide zählen. Flavopiridol (FP) weist große strukturelle Ähnlichkeit mit einem natürlichen Alkaloid in *Dysoxylum binectariferum* auf (Sedlacek, 1996). FP wird momentan in klinischen Studien erprobt und ist ein potenter Inhibitor von verschiedenen zellulären Enzymen und enzymatischen Komplexen.

FP hemmt ein breites Spektrum von Signal-transduzierenden Kinasen und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs). Die inhibierende Aktivität von Flavopiridol auf diese verschiedenen Kinasen unterscheidet sich jedoch stark. Sedlacek et al wiesen nach, dass Flavopiridol am stärksten CDKs bei klinisch erreichbaren Dosen inhibiert, speziell CDK1, CDK2, CDK4 und CDK7 (Sedlacek, 1996). Die Cyclin-abhängigen Kinasen bilden eine Familie von Serin/Threonin Protein-Kinasen, deren Aktivität von ihren Cyclin-Bindungspartnern, etwa dem Cyclin D1, abhängt. Hierbei bilden die Cycline und ihre Kinasen einen funktionellen Komplex. Diese heterodimeren Komplexe können verschiedene, im Zellzyklus involvierte Substrate phosphorylieren und spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Steuerung von Transkription und Zellzyklusaktivität (Malumbres, 2005). CDKs unterliegen verschiedenen Kontrollmechanismen durch andere Moleküle. So beeinflussen auf post-translationaler Ebene Enzyme (z.B. wee1 Kinase) die CDK-Expression (Müller, 1993).



**Abbildung 1:**

Dargestellt ist die chemisch-funktionelle Struktur von Flavopiridol (-)-cis-2-Chlorophenyl 5,7di-hydroxy-8-4(-3hydroxy-1-methyl) piperidinyl-4H-1-benzopyran-4-ein Hydrochlorid).

Sherman et al., Cancer Chemother Pharmacol (1998)

Auch die Interaktion mit den Cyclin-abhängigen-Kinasen-Inhibitoren (CDKI) z.B. p15, p18, p21, p27 sind entscheidend für eine Inhibition der CDKs, ebenso spielen Ubiquitinierungen und somit Degradierungen der CDKs und der Cyclin-Bindungspartner eine wichtige Rolle bei der Regulation dieser pro-proliferativen Kernproteine (*Guan, 1994*).

Die regulatorischen Epitope der CDKs werden von einer ATP Bindungstasche in der katalytischen Untereinheit des Cyclin/CDK-Komplexes gebildet (*DeBondt, 1993*). In der inaktiven, monomeren Form der CDK wird der Zugang zum katalytischen Epitop durch eine T-Schleife blockiert. In dieser Schleife ist das Thr160 lokalisiert, dessen Phosphorylierung zu einer Aktivitätssteigerung der CDKs führt (*Morgan, 1997*). Cokristallisations-Studien unter Verwendung von Flavopiridol und CDK2 haben gezeigt, dass der aromatische Molekülteil von Flavopiridol die hydrophobe Adenosin-Bindungsstelle von CDKs blockiert und somit Adenosin-tri-Phosphat (ATP) an der Bindung an CDKs und deren Aktivierung verhindert (*De Azevedo, 1996*).

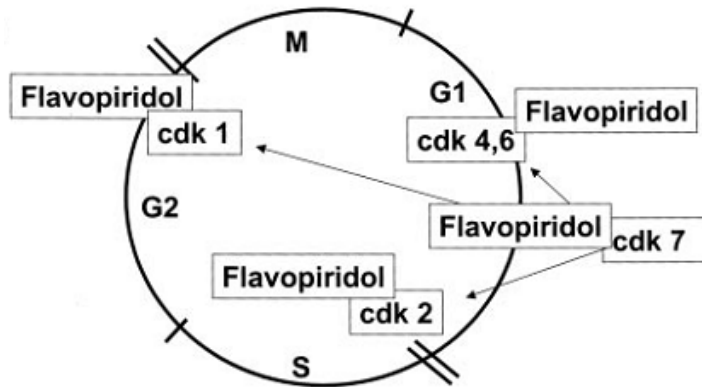
Flavopiridol bewirkt somit übereinstimmend mit der beschriebenen CDK-Inhibition einen Stillstand des Zellzyklus in der G1 und in der G2-Phase. Zusätzlich unterliegt auch CDK7, ein wichtiger Aktivator von CDK1, 2 und 4, starken inhibitorischen Effekten durch Flavopiridol. Somit werden diese wichtigen Zellzyklus-treibenden Kinasen sowohl direkt als auch indirekt gehemmt (*Carlson, 1996*). Flavopiridol wirkt jedoch nicht nur antiproliferativ, sondern zeigt eine ganze Reihe von anderen Wirkungen: *in vitro* wirkt Flavopiridol nicht nur zytostatisch, sondern auch zytotoxisch auf Zellen in der G0-Phase des Zellzyklus (*Bible, 1996*) in hämatopoetischen

|   |                    |
|---|--------------------|
| cdk4/cyclin D (1-3),<br>cdk6/cyclin D (1-3) | Mid G1             |
| cdk2/cyclin E                               | Late G1<br>phase   |
| cdk2/cyclin E, cdk2/cyclin A                | G1/S<br>transition |
| cdk2/cyclin A                               | S-phase            |
| cdk1/cyclin B, cdk1/cyclin A                | G2/M<br>transition |

**Tabelle 1:**

Tabelle 1 zeigt einige für den Zellzyklus entscheidenden CDKs mit den jeweiligen Cyclinen Bindungspartnern und die verschiedenen Zyklusphasen

Sedlacek et al., Critical Reviews in Oncology: Hematology (2001)



**Abbildung 2:**

Schematische Darstellung der CDKs, die durch Flavopiridol inhibiert werden. Flavopiridol bewirkt einen G1/S und G2/M Arrest.

Shapiro et al., Clinical Cancer Research (2004)

und epithelialen Zellreihen (Arguello, 1998, Patel, 1998) sowie im Tiermodell (Arguello, 1998, Patel, 1998, Motwani, 2001, Newcomb, 2004). Des Weiteren induziert Flavopiridol Apoptose und vermindert die Konzentrationen verschiedenster intrazellulärer Proteine (Bible, 1996). So senkt Flavopiridol die Expression von Zellzyklus-antriebenden Proteinen wie Cyclin D oder Cyclin B sowie von antiapoptotischen Proteinen, z.B. XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), Mcl-1 (Myeloid cell leukemia sequence 1), bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Mdm2 (murine double minute) oder Survivin. Ebenfalls wird VEGF (vascular epithelial growth factor), ein für das Tumorwachstum wichtiges Signalmolekül, durch Flavopiridol inhibiert (Gojo, 2002, Carlson, 1999, Wittmann, 2003, Demidenko, 2004).

Durch die Inhibition von CDK9 wirkt sich Flavopiridol nachweislich auch auf die Transkription der Zellen aus. CDK9 ist u.a. verantwortlich für die Phosphorylierung der C-terminalen-Domäne der grössten Untereinheit der RNA Polymerase II. Durch die Inaktivierung der RNA Polymerase II durch Flavopiridol wird die Initiation und die Elongation von mRNA unterbunden (Chao, 2001, Lam, 2001). Verglichen mit älteren CDK-Inhibitoren wie DRB (5-6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole) ist Flavopiridol der potenteste CDK9-Inhibitor. So hemmt Flavopiridol CDK9 bei 10-fach geringeren Konzentrationen als DRB (Heinrich, 1998). Lam et al zeigten, dass Flavopiridol auch die Expression von XIAP, Mcl-1, Bcl-xL und Mdm-2 mRNA vermindert (Lam, 2001). Dieser negative Effekt auf die Transkription von Proto-Onkogenen, anti-apoptotischen Proteinen und Wachstumsfaktoren könnte eine Erklärung für die beobachteten Wirkmechanismen sein. Auch die Expression und Funktion von p53 wird von CDKs beeinflusst und wurde als ein weiterer Wirkmechanismus von Flavopiridol diskutiert (Hecker, 1996). MCL mit einer Inakti-

vierung von p53 weisen eine signifikant schlechtere Prognose auf (*Weisenburger, 1996*).

Interessanterweise wirkt Flavopiridol *in vitro* jedoch unabhängig von der p53 Expression in Zelllinien (*Byrd, Parker, Schapiro, 1998*), wodurch Flavopiridol speziell bei Fällen mit p53 Deletionen und der damit verbundenen häufigen Resistenz gegen Zytostatika, einen besonders sinnvollen therapeutischen Ansatz bildet (*Wattel, 1994, Dohner, 1995, Byrd, 2003*). Auf diesen vielversprechenden präklinischen Ergebnissen aufbauend, wurden klinische Studien mit Flavopiridol sowohl in rezidivierten soliden als auch hämatologischen Malignomen, z.B. der CLL, unternommen (*Cordone, 1998*).

Leider erwies sich Flavopiridol *in vivo* als nicht wirksam mit insgesamt sehr geringen Ansprechraten (*Schwartz, 2002, Shapiro, 2001, Stadler, 2000, Flinn, 2005, Lin, 2002*). So erreichte Flavopiridol bei der Behandlung der rezidivierten, Fludarabin-resistenten CLL eine ORR von nur 11% und keine CR (*Byrd, 2005*).

Beim MCL zeigte eine Studie mit 28 Patienten eine ORR von 18% und keine CR, was zu einem frühen Studienabbruch führte (*Kouroukis, 2003*). Das Interesse an Flavopiridol versiegte aufgrund dieser enttäuschenden klinischen Aktivität zunehmend, bis Phelps et al. Ende 2008 eine Phase I Studie mit 52 rezidivierten CLL Fällen veröffentlichte. Diese bot eine Erklärung für die beobachtete Diskrepanz zwischen der Effektivität *in vitro* und *in vivo*. Alle bisherigen Studien hatten fortlaufende 24-72 h intravenöse Verabreichungs-Protokolle eingesetzt, wohingegen bei der Verabreichung eines 30 minütigen Bolus (30mg/qm), gefolgt von einer 4-stündigen Infusion (30-50mg/qm), erstmals CR zu beobachten waren und zu einem ORR von 40% und einem PFS vom median 12 Monaten führten (*Phelps, 2008*). Alle früheren Studien basieren auf *in vitro* Daten unter Verwendung von foetalen Kälberserum (FKS). Verglichen zu FKS weist humanes Serum jedoch eine signifikant höhere Plasmaeiweißbindung von Flavopiridol auf und führt *in vitro* zu einem Abfall des ungebundenen, aktiven Flavopiridol von 100%-63% auf 8%-5%.

Diese Untersuchungen machen deutlich, warum höhere Plasmakonzentrationen von Flavopiridol nötig sind, um einen klinischen Effekt zu erzielen. Auf der Basis dieser neueren Erkenntnisse werden zukünftige Studien die Aktivität in malignen Tumoren von Flavopiridol neu untersuchen und zu verlässlicheren Daten führen (*Lin, 2009*).



## 2.2 Bendamustin

Bendamustin, 4-{5-[bis(2-chloroethyl)amino]-1-methyl-2-benzimidazolyl}, wurde in den 1960er Jahren in der ehemaligen Deutschen Demokratischen Republik entwickelt und von der Firma Jenapharm in den 1970er Jahren erstmals unter dem Namen Cytostasan auf den Markt gebracht. Bendamustin zeigt nachweislich klinische Aktivität gegen NHL einschliesslich MCL (*Rummel, 2005, Friedberg, 2008*), CLL (*Bergmann, 2006*), Brustkrebs (*von Minckwitz, 2005*), multiples Myelom (*Ponisch, 2006*) und kleinzelligen Lungenkrebs (*Schmittel, 2007*). In Deutschland ist es mittlerweile zur Therapie des Morbus Hodgkin, von Non Hodgkin-Lymphomen, insbesondere der CLL, des Multiplen Myeloms sowie von Brustkrebs zugelassen. Ziel der Entwicklung war es, ein bifunktionales Chemotherapeutikum mit alkylierenden und potentiell antimetabolischen Eigenschaften zu entwickeln (*Ozegowsk, 1971*). Dabei zeichnet sich die Substanz chemisch durch eine gute Wasserlöslichkeit und klinisch durch ein mildes Nebenwirkungsprofil aus. Klinische Untersuchungen belegen eine nur geringe Kreuzresistenz mit anderen Alkylantien wie Melphalan, Cyclophosphamid, Cisplatin und Carmustin (*Strumberg, 1996*). Weiterhin deutet die fehlende Kreuzresistenz auf eine, mit konventionellen Alkylantien verglichen, andere oder komplexere Wirkungsweise hin (*Ghandi, 2002*).

Strukturell besteht Bendamustin aus 3 verschiedenen chemischen Gruppen: einer alkylierenden 2-Chloroethylamin-Gruppe, einem Benzimidazol-Ring und einer Butanol-Hydrochlorid-Seitenkette. Bendamustin hat die 2-Chloroethylamin-Gruppe mit anderen Stoffen aus der Gruppe der Alkylantien (z.B. Melphalan, Cyclophosphamid, Chlorambucil) gemeinsam. Der wesentliche strukturelle Unterschied ist der zentrale Benzimidazol-Ring. Dieser heterozyklische Ring scheint ausschlaggebend für die speziellen antineoplastischen Effekte von Bendamustin zu sein und der entscheidende Unterschied im Wirkungsprofil zu herkömmlichen 2-Chloroethylamin Alkylantien zu sein. Dieser Ring könnte zu einer nukleosidanalogen Wirkung führen (*Woolley, 1944, Hirschberg, 1957*).

Ähnlich zu den anderen Alkylantien bewirkt Bendamustin im Zellkern Abbrüche und Quervernetzungen des DNA-Stranges, jedoch scheinen die durch Bendamustin verursachten Einzel- und Doppelstrangabbrüche ausgeprägter und dauerhafter zu sein, verglichen mit anderen Alkylantien (*Hartmann, 1972*). Eine Möglichkeit, verschiedene zytotoxische Substanzen unter Verwendung einer Vielzahl von standard-

isierten *in vitro* Werten zu vergleichen, bietet der NCI Antitumor Screen (IVCLSP) (Monks, 1991). Leoni et al. demonstrierten anhand dieser Analysen, dass BM lediglich geringe Ähnlichkeiten zum Wirkungsprofil von Dacarbazin aufweist. Dies führt zu der Vermutung, dass Bendamustin aufgrund des vermuteten dualen Mechanismus Apoptose-Signalwege und die Expression von p53 regulierten Genen stärker aktiviert als Cyclophosphamid und Chlorambucil. Gleichzeitig bewirkt Bendamustin eine Inhibition von verschiedenen Mitose-Kontrollpunkten und bewirkt in Mitose-Zellen mit DNA-Schäden eine so genannte „mitotic catastrophe“ (Leoni, 2008), eine Kombination aus DNA-Schäden und fehlerhaften Zellzyklus-Kontrollpunkten, die in einer speziellen Form des Zelltodes mündet. Diese Form des Zelltodes ist gekennzeichnet durch eine fehlerhafte chromosomale Segregation und einer starken zusätzlichen Aktivierung von pro-apoptotischen Stimuli. (Castedo, 2004). Ebenso aktiviert Bendamustin in CLL und im MCL p53-unabhängig die intrinsische mitochondriale Apoptose-Kaskade vollständig (Roue, 2008).

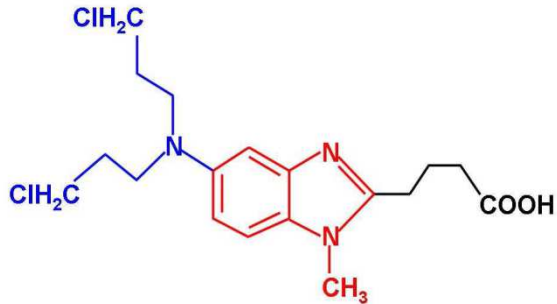
Diese „mitotic catastrophe“, in Verbindung mit der p53-unabhängigen Apoptose-aktivierung durch Bendamustin, wird als Erklärung für die beobachtete Effektivität in chemotherapie-resistenten Tumoren diskutiert. Zusätzlich scheint BM verschiedene DNA-Reparatursysteme stärker zu aktivieren als konventionelle Alkylantien (Friedberg, 2008).

Eine multizentrische Phase-II-Studie, die die Effektivität und Verträglichkeit der Kombination Bendamustin plus Rituximab (B-R) bei 63 Patienten mit rezidivierten oder refraktären indolenten Lymphomen oder Mantelzelllymphomen untersuchte, zeigte für die Kombination aus Bendamustin und Rituximab eine hohe Effektivität mit einer ORR von 90% und erwies sich außerdem als sehr gut verträglich (Rummel, 2005).

In Deutschland verglich die Studiengruppe indolente Lymphome (StIL) die Kombination aus Bendamustin und Rituximab (B-R) in einer Phase-III-Studie mit dem bisher etablierten Regime CHOP plus Rituximab (R-CHOP) bei insgesamt 513 zuvor unbehandelten Patienten mit Follikulären-, Marginalzonen-, Mantelzelllymphomen und Morbus Waldenström.

Die Rate von CR und die Dauer des PFS von B-R lag bei diesen Entitäten signifikant höher als von R-CHOP (39,6 % vs 30,0 % CR; 54,9 vs. 34,8 Monate PFS) bei einer insgesamt deutlich verbesserten Verträglichkeit. Insbesondere sprechen eine geringere Rate an therapieassoziierten Infektionen, Neuropathien und Alopezie für

den Einsatz von B-R als Erstlinientherapie und könnte zukünftig R-CHOP als Erstlinientherapie bei diesen Erkrankungen ersetzen (*Rummel, 2009*).



**Abbildung 3:**

Dargestellt ist die chemisch-funktionelle Struktur Bendamustins: 4-{5-[bis-(chloroethyl)-amino]-1-methyl-2 benzimidazolyl} -Butanol-Hydrochlorid. Die N-Lost-Gruppe als Merkmal der Alkylanzien ist blau, der Benzimidazolring als Purinanalogen rot, und die Butanol-Hydrochlorid-Seitenkette schwarz hervorgehoben

### 3 Zielsetzungen dieser Arbeit

Das Mantelzelllyphom wird analog zu den indolenten NHL als nicht kurabel eingestuft, weist jedoch ein signifikant verkürztes medianes Gesamtüberleben auf und stellt somit für die Klinik eine Kombination aus den negativen Eigenschaften von indolenten (kein Überlebensplateau) und aggressiven Lymphomen (rasche Progredienz) dar (*Weisenburger, 2000*).

Das MCL stellt trotz intensiver Therapie aufgrund seiner frühzeitigen Rezidive eine große Herausforderung an die Medizin. Eine große Anzahl neuer Substanzen (molekular angreifende Stoffe und konventionelle Chemotherapeutika) werden z.Z. auf ihre Wirksamkeit beim MCL geprüft.

Zwei dieser Stoffe sind Flavopiridol, ein molekularer Serin/Threonin-Kinase-Inhibitor, und Bendamustin, ein bereits in der Klinik etabliertes Zytostatikum.

Gegenstand dieser Arbeit ist zum einen die bessere Charakterisierung der Wirkung beider Substanzen auf MCL-Zelllinien *in vitro*, sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit anderen Medikamenten.

Ein Hauptziel ist es, einen potentiellen Synergismus der untersuchten Medikamente aufzudecken. Die gewonnenen Ergebnisse sollen eine Grundlage bilden für eine zukünftige Verbesserung der Therapie des MCL.

Als eine der Basismethoden wird hierzu die Zellzahlbestimmung mittels Trypan-Blau Ausschlusstest und Vi-Cell Analysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Dosierungen nach Behandlung mit Bendamustin, Flavopiridol und in Kombination mit anderen Substanzen angewandt.

Ziel dieser Untersuchungen ist es, Dosis-Wirkungskurven zu erstellen, zeitabhängige Zellzahlreduktionen zu quantifizieren und synergistische Interaktionen durch Verrechnung der Ergebnisse aus Mono- und Kombinationsversuchen aufzudecken.

Der Einfluss auf den Stoffwechsel im Sinne einer Inhibition der untersuchten Substanzen wird in der vorliegenden Arbeit kolorimetrisch mittels WST-1 Assay

bestimmt und für alle Zelllinien  $IC_{50}$  Werte definiert.

Zum Anderen wird Flavopiridol hinsichtlich seines Wirkungsprofils auf verschiedene Zellprogramme genauer untersucht:

Der Effekt von Flavopiridol auf den Zellzyklus, zu verschiedenen Zeitpunkten und in verschiedenen Dosierungen, wird mittels Propidium-Iodid FACS durchflußzytometrisch quantifiziert und in Kontext mit der Sensitivität der einzelnen Zelllinien gebracht.

Ebenso werden Proteinexpressionsveränderungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung durch Western-Blot Analysen detektiert und densitometrisch operationalisiert. Diese Ergebnisse werden ebenfalls mit den unterschiedlichen Sensitivitäten der einzelnen Zelllinien korrelieren.

## 4 Material und Methoden:

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 Verwendete Zelllinien – Charakterisierung

| Zelllinien        | Charakterisierung   |
|-------------------|---|
| <b>Granta 519</b> | <b>B-NHL (MCL)</b> , etabliert 1991 aus peripheren Blut einer 58 Jahre alten Frau Rudolph et al. 2004<br>Karyotyp: hypodiploid, 8% polyploidy; 44(39-44)<2n>XX, -12, -17, -18, +mar, add(1)(p22), del(3)(p14p23), i(8p), i(8q), add(9) (p22)x1-2, t(11;14)(q13;q32), add(13)(p12), add(18)(q21)   |
| <b>HBL-2</b>      | <b>B-NHL (MCL)</b> , etabliert 1985 aus dem Lymphknoten eines 84 Jahre alten Mannes, Abe et al. 1988<br>Karyotyp: 46, X, -Y, +7, der(?)t(3;?)(p13;?), der(4)t(1;4)(q21;p15.2), t(11;6;9)(q11;p23q21;p22), add(8)(p23), der(9)t(3;9)(q21;p22), del(9)(q32), add(11)(q23), der(11) t(?;11;14)(?;q13;q32), add(13)(q23), der(14)t(11;14)(q12.2;q32.3), t(11;14) (q32.3;q15), add(15)(p12), add(17)(p13), add(18)(q23), der(22)t(9;22)(q11;p12)   |
| <b>Jeko-1</b>     | <b>B-NHL (MCL)</b> , etabliert 1998 aus peripheren Blut einer 78 Jahre alten Frau Jeon et al. 1998<br>Karyotyp: hypertriploid 0-78<3n>XXXX, +X, +1, +2, +2, +4, +6, +7, -8, +10, +11, -12, -12, +13, +14, +15, -17, +18, -19, -19, -22, +2-4mar<br>del(X)(p21)/add(X)(p11.2)x2, der(X)t(X;11)(q26-28;q13)t(11;?10) (q24;?p12), der(1) t(1;2)(p21;q22)x2, add(2)(q2?), del(2)(q11), add(3)(q27), der(5)t(5;12) (p15;p11-12)x2, add(6)(p21)x2, der(6;13)(p10;q10)x1-2, der(7)t(4;7) (q2?6;q32.1)x2, add(9)(p2?), der(9)t(9;14)(q34-35;q32-33)x2, der(10)t(10;11) (p12;?)x2, der(11)t(11;14)(q13;q32)x1-2, add(13)(p11), der(13)t(13;?)(p11;?)t(?;13)(?;q11), add(14)(p11), der(14)t(14;17)(p12;q11)t(14;6)(q24;?p11), der(14)t(11;14)(?;p11)t(11;?8)(?;?), del(16)(p11), add(17)(p11), ns(19;12)(q13.1;q13.2q2?4)x2 |
| <b>JVM-2</b>      | <b>B-NHL (MCL)</b> , etabliert 1984 aus peripheren Blut einer 63 Jahre alten Frau Melo et al. 1988<br>Karyotyp: pseudodiploid mit 1.8% Ployploidie- 46(42-46)<2n>XX, t(1;15)(q32.3;q22.1), der(8)t(3;8)(q13;p21), t(11;14)(q13;q32), dup(16)(p11p13.2), t(11;14)  |
| <b>Jurkat</b>     | <b>T-ALL</b> , etabliert 1976 aus peripheren Blut eines 14 Jahre alten Mannes Schneider et al. 1977<br>Karyotyp: hypotetraploid, 8% polyploid, 87(78-91)<4n>XX, -Y, -Y, -5, -16, -17, -22, add(2)(p21)/del(2)(p23)x2 der(5)t(5;10)(q11;p15), del(9)(p11)  |
| <b>Karpas 422</b> | <b>B-NHL (DLCL)</b> , etabliert 1987 aus Pleuraerguss einer 73 Jahre alten Frau, zuerst beschrieben von Dyer et al. 1990<br>Karyotyp: hyperdiploid, 10% polydiploid 47(44-48)<2n>XX, +14, t(2;10)(p23;q22), t(4;11) (q21;q24), t(4;16)(q21;p13), der(14)t(14;18)(q32;q21)x2   |
| <b>NCEB-1</b>     | <b>B-NHL (MCL)</b> , etabliert 1987 aus peripheren Blut eines 67 Jahre alten Mannes, Saltmann et al. 1988<br>Karyotyp: 43, X, -Y, -12, -15, -17, +mar, der(5)t(5;12)(p14;q12), der(8)t(8;?)(p11.2;?), t(9;?;13)(q32;?;q14), der(10)t(10;15)(q24;q15), t(11;14)(q13;q32)   |
| <b>Z-138</b>      | <b>B-NHL (MCL)</b> , etabliert 1987 aus peripheren Blut einer 70 Jahre alten Frau Estrov et al. 1997<br>48, XY, +3, +13, 8q-, t(llq-;14q+), t(14q+;18q-) 49, XY, +3,+12, +13, 8q-, t(llq-;14q+), t(14q+;18q-)   |

Die in der Arbeit verwendeten Zelllinien sind die etablierten humanen MCL-Zelllinien Granta 519, HBL-2, JeKo-1, NCEB-1, JVM-2, Z-138 sowie als Kontrollzelllinien Jurkat (humane T-Zell Leukämie, T-ALL) und Karpas 422 (humanes diffus groß-zelliges Lymphom). Z-138 wurde von LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland, alle anderen Zelllinien wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Deutschland bezogen.

#### **4.1.2 Bedingungen der Zellkultur**

Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Granta 519, JeKo-1 und NCEB-1 wurden in Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) in RPMI-1640 Medium kultiviert, das mit 20% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde, HBL-2, Jurkat, JVM-2 und Karpas 422 in RPMI-1640 Medium mit 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin. Vor der ersten Verwendung wurde das FKS nach dem Auftauen bei 56°C für 50 Minuten im Wasserbad erhitzt, um die noch vorhandenen hitzeempfindlichen Komponenten des Komplementsystems im Serum zu zerstören. Alle verwendeten Zelllinien wurden dreimal wöchentlich zell-dichteabhängig gesplittet, wobei jeweils 50-75% der Zellsuspension durch frisches Medium ersetzt wurde. Die Zellreihen wurden alle 3 Monate auf mitochondriale Polymorphismen gescreent, um Kreuzkontaminationen sowie eine Mycoplasmen-Kontamination auszuschließen (*Hutter, 2004*). Bei positivem Erreger-Nachweis wurden die Kulturen beseitigt und durch frisches Material ersetzt.

#### **4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien**

Alle Zelllinien wurden für 5 min bei 1000 Umdrehungen/Minute abzentrifugiert, anschliessend bei 4°C in 90% FKS und 10% gekühltem DMSO aufgenommen und sofort bei -80°C im Gefrierschrank gelagert. Zum Re kultivieren eingefrorener Zellen wurden diese aufgetaut, die Zellsuspension in 15ml gekühltes Medium überführt und sofort abzentrifugiert (250 rpm, 10min, 4°C), um Reste des zelltoxischen Dimethylsulfoxid zu entfernen. Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellen in 10ml frischem Kulturmedium aufgenommen und für 24h mit erhöhter FKS-Konzentration von 20% kultiviert.

## 4.2 Methoden der Zellquantifizierung

### 4.2.1 Trypanblau-Ausschlusstest

Zur routinemäßigen Bestimmung der Zellzahl und Viabilität der kultivierten und behandelten Zelllinien wurde der Trypanblau-Ausschluß-Test verwendet. Tote Zellen werden durch Trypanblau angefärbt, während lebende Zellen aufgrund einer noch intakten Zellmembran fähig sind, den Farbstoff aktiv aus dem Zellinneren in das extrazelluläre Medium zurück zu pumpen und so bei der Bestimmung der Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer im Durchlichtmikroskop hell bzw. ungefärbt bleiben. Die Zelldichte wird durch die Anzahl der Zellen in vier Großquadraten bestimmt, wobei bei einer Mischung von Zellsuspension zu Trypanblau von 1:1 (10µl:10µl) folgende Formel gilt:

$$(N_2) = (N_1/2) \times 10^4$$

Hierbei gibt  $(N_1)$  die Zellzahl in vier Großquadraten der Neubauer-Zählkammer an,  $(N_2)$  die Zellzahl pro ml Zellsuspension.

### 4.2.2 Vi-Cell Zellzählung

Vi-Cell ist ein von Beckmann Coulter hergestelltes, automatisiertes Zellzählgerät. Analog zu dem oben beschriebenen Trypanblau-Ausschlusstest analysiert das Vi-Cell Gerät die Zellviabilität mittels Trypanblau. Ein Aliquot der zu untersuchenden Zellen wird als Eichung vorher in das System eingegeben (default), darauffolgend wird 1ml der Zellsuspension mit Trypanblau vermischt und von dem Gerät aspiriert. Das Aspirat wird anschließend in einem Durchfluss Zytometer gepumpt und von jeder Probe werden 100 Einzelaufnahmen gemacht.

Die Software analysiert mittels digitalisierten Aufnahmen und einer Umwandlung in eine Pixelmatrix die Anzahl der Zellen, welche Trypanblau aufgenommen haben bzw. welche nicht. Für jedes Element auf den Aufnahmen wird eine Leuchtdichte von 0 (Schwarz) bis 255 (weiß) errechnet. Aufgrund dieser Skalierung kann die Software Zellen erkennen, welche Trypanblau aufgenommen haben. Zellen mit höheren Werten werden als viabel charakterisiert. Die somit ermittelten Daten über absolute



Zellzahl, Viabilität und Anzahl viabler Zellen werden automatisch gespeichert und ausgewertet.

#### 4.2.3 Errechnung der Fraction of Product

Um potentiell synergistische Effekte zweier in Kombination verabreichter Medikamente zu detektieren, wurde mittels Vi-Cell Viabilitätsanalysen der Zelllinien durchgeführt. Hierzu wurden 5 ml ( $0.5 \times 10^6$ /ml) der Zelllinien mit den zu untersuchenden Medikamenten in einer festgelegten Konzentration als Monotherapie und in Kombination mit 100nM Flavopiridol exponiert. Die Viabilität der einzelnen Proben wurde zu definierten Zeitpunkten (24h, 48h, 72h) gemessen. Die relative Zellzahlverminderung der behandelten Proben wird so verglichen mit dem jeweiligen Tageswert der unbehandelten Kontrolle, und in Prozent angegeben (=fraction affected, **FA**). Die Ergebnisse werden in folgender Formel nach Webb verrechnet (Webb et al 1963):

$$[(1-FA \text{ Substanz A}) \times (1-FA \text{ Substanz B})] - (1-FA \text{ Kombination Substanz A+B})$$

Resultate, welche nach Kalkulation grösser +0.1 sind, werden als synergistisch, Resultate, welche kleiner -0.1 sind als antagonistisch, Werte zwischen diesen Grenzwerten als additiv bewertet.

#### Verwendete Medikamente und Konzentrationen für Kombinationen:

|                   |            |
|-------------------|------------|
| Flavopiridol:     | 100nM      |
| RAD 001 :         | 100nM      |
| Fludarabin:       | 0,25µg/ml  |
| Enzastaurin:      | 5µM        |
| Ara-C Cytarabine: | 0,625µg/ml |
| Gemcitabine:      | 0.025µg/ml |

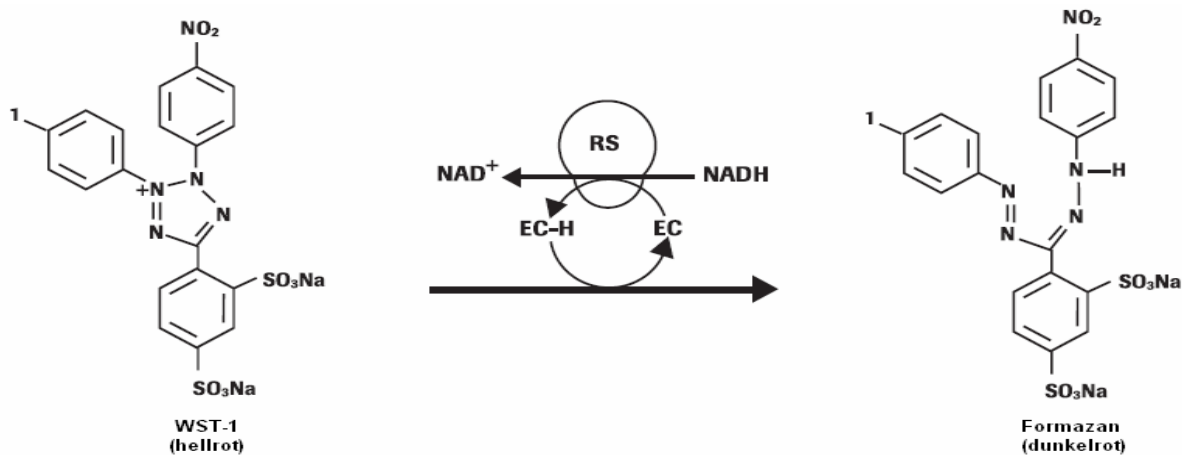
### 4.3 WST-1 Zell-Proliferationsassay

Zur Bestimmung der Viabilität einer Zellpopulation wurde neben dem Trypanblau-Ausschlusstest der so genannte WST-1 Assay verwendet, der auf einer Metabolisierung des Tetrazoliumsalses 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolol]-1,3-Benzendisulfonat zum ringoffenen Formazansalz beruht, wobei ein Farbumschlag beobachtet wird, der kolorimetrisch ausgewertet werden kann. Nur metabolisch aktive Zellen deren mitochondriale Dehydrogenasen das Tetrazoliumsals zum Formazansalz umwandeln können, bewirken einen Farbumschlag. Dabei gibt das Absorptionsmaximum relativ spezifische Rückschlüsse auf die Quantität stoffwechselaktiver Zellen im Medium, d.h. die Stärke des Farbumschlags ist proportional zur Anzahl der stoffwechselaktiven Zellen.

Die Änderung des Absorptionsmaximums lässt sich anhand eines Spektrophotometers (ELISA-Reader) messen und graphisch darstellen. Bei Substanzen stellt sich nach einer gewissen Zeit ein dynamisches Gleichgewicht ein, bei dem die Konzentrationen aller Reaktionspartner untereinander in einem bestimmten Verhältnis stehen. Das entspricht dem Massenwirkungsgesetz. So wird nie eine theoretische optische Dichte ( $\text{Absorption}_{450\text{nm}} - \text{Absorption}_{690\text{nm}}$ ) von 0 erreicht. Dieser Fehler kann jedoch durch Verrechnung der erhaltenen Messwerte mit dem Blank-Wert beseitigt werden, der nur Medium und zugesetzte Reagenzien enthält. Der WST-1 Assay wurde mit Hilfe des Anwendungspakets von Roche Diagnostics (Mannheim) nach Herstellerangaben für Proliferationsversuche durchgeführt. Dafür wurden die Zellen auf die gewünschte Dichte ( $1,0 \times 10^6/\text{ml}$ ) eingestellt und in 96-Well-Platten mit flachem Boden ausgesät (100 $\mu\text{l}$  der eingestellten Zellsuspension), wobei jeder Wert als Triplet ange setzt und photospektrometrisch vermessen wurde. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit 10 $\mu\text{l}$  WST-1 Reagenz versetzt und nach 4-stündiger Inkubation die optische Dichte am ELISA-Reader gemessen. Für die optimale Einstellung der Wellenlänge für die Messung der Absorption des Formazan-Produktes, in Anlehnung an das Lambert-Beersche Gesetz, sollte der Filter des ELISA-Readers zwischen 420 und 480 nm eingestellt sein (maximale Absorption im Bereich von 440 nm), die Referenz-Wellenlänge sollte mehr als 600 nm betragen.

Aus den drei erhaltenen Messwerten pro 96-well-Platte wurde der Mittelwert gebildet, hiervon der Mittelwert der Blank-Werte abgezogen und die sich daraus ergeben

Werte auf den Kontrollwert bezogen. Zur Bestimmung der proliferationshemmenden Potenz einer Substanz wurde der IC<sub>50</sub>-Wert herangezogen, der die Konzentration eines Inhibitors angibt, bei dem die Proliferation der Zellen auf die Hälfte des Betrags der unbehandelten Zellen abgesunken ist. Die Versuche zur Bestimmung der IC<sub>50</sub> wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt, aus den Messwerten der Einzelmessungen wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt.



#### Abbildung 4: Spaltung des Tetrazoliums Salzes WST-1

Das hellrote Tetrazoliums Salz WST-1 wird durch das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase System (RS) zum dunkelroten Formazan gespalten. Der hierbei stattfindende Farbumschlag ist kolorimetrisch messbar und korreliert mit der Zahl der stoffwechselaktiven Zellen (Abbildung aus dem Manual des Herstellers Roche Diagnostics, Mannheim).

#### 4.4 Kombinatorische Indizes nach Chou und Talalay

Zur Bewertung der Effekte zweier kombinierter Substanzen im Zellkulturmodell wurde die Methode nach Chou und Talalay herangezogen, die auf der Bestimmung der kombinatorischen Indizes  $C_i$  beruht (Chou, 1981, 1984). Dieser lässt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$C_i = \frac{D_A}{D_{xA}} + \frac{D_B}{D_{xB}} + \frac{D_A \cdot D_B}{D_{xA} \cdot D_{xB}}$$

Hierbei gibt  $D_A$  und  $D_B$  die Dosis der Inhibitoren A und B an, die in Kombination zu einem Effekt von x % führen, während  $D_{xA}$  und  $D_{xB}$  die jeweilige Dosis des Inhibitors nach Einzelgabe darstellen. Der Term der Gleichung  $D_A D_B / D_{xA} D_{xB}$  geht nur für Inhibitoren in die Gleichung ein, deren jeweiliger Wirkmechanismus von dem des anderen unabhängig ist. Ein nicht-unabhängiger Wirkmechanismus lässt sich unter anderem aus dem parallelen Kurvenverlauf zweier Inhibitoren im Median- Effekt-Plot ersehen. Die oben genannte Gleichung besitzt unendlich viele Lösungen, die vom jeweiligen Wert x bestimmt werden, also in welchem Dosisbereich der Inhibitoren  $C_i$  errechnet wird. In der Literatur wird häufig ein  $C_i$  für die  $IC_{50}$ ,  $IC_{75}$  und  $IC_{90}$  angegeben. Um diese  $C_i$ -Werte zu berechnen, müssen allerdings  $D$  und  $D_x$  genau bestimmt werden. Für die Berechnung des  $C_i$  bei  $IC_{50}$  ergibt sich dann folgende Gleichung:

$$C_i_{IC\ 50} = \frac{IC\ 50_{Comb\ (A+B)}}{IC\ 50_A} + \frac{IC\ 50_{Comb\ (A+B)}}{IC\ 50_B}$$

Hierbei gibt  $IC_{50A}$  und  $IC_{50B}$  die  $IC_{50}$  Werte für die Einzelsubstanzen an,  $IC_{50Comb(A+B)}$  den  $IC_{50}$  Wert bei Kombination der beiden Substanzen. Die  $C_i$ -Werte wurden mit Hilfe der CalcuSyn Software berechnet. Synergistische Effekte werden als „besser als der erwartete additive Effekt“, antagonistische Effekte als „schlechter als der erwartete additive Effekt“ definiert. Das heißt,  $CI > 1$  deutet auf Antagonismus und  $CI < 1$  auf Synergismus hin. Da die beobachteten Effekte jedoch im biologischen System weiter abgestuft werden können, ist folgende Einteilung der  $CI$  Werte modifiziert nach Reynolds und Maurer besser zur genaueren Beurteilung des Effektes geeignet:

|            |                          |
|------------|--------------------------|
| < 0.1      | sehr starker Synergismus |
| 0.1 - 0.3  | starker Synergismus      |
| 0.3 - 0.7  | Synergismus              |
| 0.7 - 0.9  | leichter Synergismus     |
| 0.9 - 1.1  | additiver Effekt         |
| 1.1 - 1.45 | leichter Antagonismus    |
| 1.45 - 3.3 | Antagonismus             |
| >3.3       | starker Antagonismus     |

## 4.5 Apoptose Detektion mit Annexin V-PE und 7-AAD-Färbung

Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen in einer Kultur wurde das „Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I“ von BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Der Test beruht auf einer Doppelfärbung von apoptotischen beziehungsweise toten Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V und dem rötlichen 7-AAD. Eines der ersten Anzeichen für das Einsetzen von Apoptose in Zellen ist der Verlust der Membran-Asymmetrie der Zellen, es kommt zur Exposition des Membranphospholipids-Phosphatidylserin (PS) auf der äußeren Lage der Plasmamembran. Dieser Prozess tritt neben dem Verlust des Membranpotentials und der verstärkten Produktion von Superoxid-Anion-Radikale lange vor nukleärer Apoptose mit Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung auf (Castedo, 1996). Mittels Annexin V, einem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigem, Phospholipid-bindendem Protein mit hoher Affinität für PS können bereits Zellen in einem frühen Stadium der Apoptose identifiziert werden. Annexin V wird an Fluorochrome wie Phycoerythrin gekoppelt, wodurch es als sensitive Sonde für die durchflusszytometrische Analyse apoptotischer Zellen geeignet ist. Die Anfärbbarkeit von Zellen mit Annexin V-PE geht dem Verlust der Membranintegrität voraus, der die späten Stadien des Zelltods charakterisiert. Daher wird die Färbung mit Annexin V-PE typischerweise mit einem so genannten Vitalfarbstoff wie 7-Aminoactinomycin (7-AAD) kombiniert. 7-AAD kann zwischen Cytosin und Guanin interkalieren und nur in Zellen mit nicht mehr intakter Membranintegrität eindringen. Mittels Doppelfärbung kann zwischen intakten Zellen (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. Für jede Analyse wurden die korrekten Einstellungen des Durchflusszytometers anhand von nicht- beziehungsweise einfachgefärbten Proben ermittelt. Annexin V-PE wurde in Fluoreszenzkanal FL-2 und 7-AAD in Fluoreszenzkanal FL-3 detektiert. Die Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe von WinMDI®. Der prozentuale Anteil Apoptotischer Zellen wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

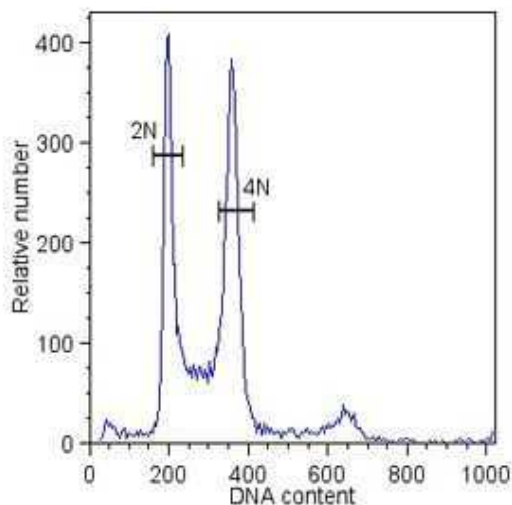
$$[1 - (AI,b/AI,u)] \times 100\%$$

Hierbei steht **AI,b** für den Anteil lebender und behandelter Zellen, **AI,u** für den Anteil lebender und unbehandelter Zellen

## 4.6 Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid Färbung

Zur Durchführung von Zellzyklusanalysen wurden die Zellen zum entsprechenden Zeitpunkt gezählt, aus der Zellkultur entnommen und auf 200 000 pro FACS-Röhrchen eingestellt. Anschließend wurden die Ansätze einmal mit kaltem PBS gewaschen, auf Eis mit 200 µl Lysis-Puffer für PI-Färbung (Propidiumiodid) versetzt und 5 min. unter Lichtausschluss lysiert. Sofort nach der Lyse wurden die Zellen im Durchflußzytometer analysiert.

Es wurden mindestens 10 000 Zellen gemessen und die Ergebnisse mit Hilfe von dem Analyseprogramm ModFit LTTM der Firma Verity Software House ausgewertet. Hierbei wurde eine Histogramm-Darstellung gewählt, bei der auf der X-Achse die Fluoreszenz-Intensität von Kanal FL-2 und auf der Y-Achse die Anzahl der detektierten Ergebnisse aufgetragen wurde, wobei sowohl die Werte auf der X-Achse als auch auf der Y-Achse linear dargestellt wurden, und die automatische Analyse mit dem Programm ModFit LTTM durchgeführt (Abbildung 5). Der erste Peak entspricht Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase, der zweite Peak mit etwa der doppelten Intensität des ersten den Zellen der G<sub>2</sub>/M-Phase, und der Intermediär-Bereich den Zellen, die sich in der S-Phase befinden. Zellen, die DNA-Fragmentationen aufweisen und daher eine Fluoreszenz im Sub-G<sub>1</sub>-Bereich zeigten, wurden als apoptotisch angesehen und bei der Auswertung der Zellzyklusverteilung hier nicht weiter berücksichtigt.



**Abbildung 5: Repräsentatives Histogramm einer FACS Analyse mittels Propidium Iodid:**

Der erste Peak wird von den Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase gebildet (2N), der zweite Peak von Zellen, die sich in der G<sub>2</sub>/M Phase des Zellzyklus befinden (4N). Dazwischen Zellen der S-Phase. X-Achse FL-2 linear, y-Achse Events abgebullet (ModFit LT).

## 4.7 Western-Blot

Der Western-Blot dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Nach Auftrennung der Proteine, abhängig von ihrer Größe im elektrischen Feld, werden diese auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgt der Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers. Der gebundene erste Antikörper wird durch einen zweiten Antikörper, der an Peroxidase gekoppelt ist, detektiert. Für die Western Blot-Analyse wurden Zellproben von  $1 \times 10^6$  Zellen entnommen und durch Zentrifugation (500rcf, 10min) sedimentiert. Der Zelleniederschlag wurde sofort in SDS-Lysepuffer (4% SDS, 100mM Tris, 20% Glycerin und 10% beta-Merkaptoethanol) aufgelöst und mindestens 1h bei Raumtemperatur lysiert. Die Proteinproben wurden anschließend im Heizblock bei 96°C erhitzt, um die Proteine voll ständig zu denaturieren und bis zum Laden des SDS-Gels auf Eis gelegt. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in einer Mini-Protean II Elektrophoresekammer, wobei 10%-SDS-PAGE-Gele (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) verwendet wurden. Die Auftrennung der Proteine wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Dabei wurde die Spannung in drei Schritten gesteigert. Die Elektrophorese wird mit 60V für 30min gestartet um den Eintritt der Proteine in das Sammelgel zu erleichtern, für 1h auf 80V erhöht bis alle Proteine in das analytische Gel übergetreten waren und zuletzt für etwa eine weitere Stunde auf 121V gesteigert. Nach der Proteinseparation im Trenngel wurden die Proteine in einer BioRad Semi-Dry Western Blot Transferkammer bei 250mA 150min auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) übertragen. Die Membranen wurden 2h in NET-Puffer mit 10% Gelatine (G-NET) mit unspezifischen Proteinen abgesättigt und über Nacht mit den entsprechenden Antikörperverdünnungen (CDK2 1:5000, rabbit monoclonal antibody; CDK4 1:500, mouse monoclonal antibody; CDK7 1:2000, mouse monoklonal, Cell Signalling Technologies; CDK9 1:2000, rabbit monoclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology und p53 1:500, monoclonal anti mouse, GIBCO) bei 4°C auf einem Probenroller inkubiert. Nach drei 15-minütigen Waschschrinen mit TBS (tris buffered saline), versetzt mit 1% Tween20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat), wurden die Membranen mit den sekundären Antikörpern in einer Verdünnung von 1:1000 in G-NET 1h bei 4°C auf einem Probenroller inkubiert.

Anschließend wurden die Membranen wiederum dreimal mit TBS 1% Tween20 gewaschen und die Antikörper durch die HRP-Luminol-Reaktion (horse reddish peroxidase, enhanced chemoluminescence detection (ECL) kit, Amersham Biosciences) mittels Kodak® BioMax MS Film, MS-1 detektiert. Zur Quantifizierung der Western Blot-Banden wurde das Computerprogramm TINA2.0 der Firma Raytest GmbH verwendet, das aus den optischen Dichten der Probenbanden im Verhältnis zur beta-Aktin-Kontrolle und dem Hintergrund die relative, korrigierte Intensität der Proteinbanden berechnet



## 4.8 Material

### 4.8.1 Lösungen und Puffer

Zellkulturmedien (RPMI 1640 mit L-Glutamin) FKS (Fetalem Kälber Serum) und DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) wurden bei PANBiotech GmbH (Aidenbach) bezogen.

#### Selbst hergestellter Lysis-Puffer für PI-Färbung:

|                 |                  |
|-----------------|------------------|
| Aqua purificata | 100ml            |
| Triton X-10     | 100µl            |
| Propidiumiodid  | 2mg              |
| Natriumcitrat   | 100mg            |
| PH 8.0          | mit HCl titriert |

### 4.8.2 Verwendete Inhibitoren und Zytostatika und Aufbewahrung

|                     |   |
|---------------------|---|
| <b>Bendamustin</b>  | 2.5 mg/ml in NaCl, Ribosepharm, (München, BY, GER)  |
| <b>Bortezomib</b>   | 100 nM in Aqua pur, Millenium (Cambridge, MA, USA)  |
| <b>Cytarabin</b>    | 50mg/ml in NaCl, Cell pharm GmbH (Hannover)         |
| <b>Enzastaurin</b>  | 10mM, Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA)             |
| <b>Flavopiridol</b> | 10 mM in DMSO, Sanofi Aventis (Vitry sur Seine, FR) |
| <b>Fludarabine</b>  | 25mg/ml in NaCl, Bayer (Leverkusen, RLP, GER)       |
| <b>Gemcitabine</b>  | 38mg/ml in NaCl, Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA)  |
| <b>Rad001</b>       | 20mM in DMSO, Novartis (Basel, BSL, CH)             |

Bendamustin, Cytarabin, Fludarabin und Gemcitabin wurden für die jeweiligen Experimente von der Apotheke des Klinikums Grosshadern der Ludwig-Maximilians-Universität am Tag des Versuchs frisch angesetzt.

### 4.8.3 Verwendete Antikörper

|                                     |                              |
|-------------------------------------|------------------------------|
| CDK2 monoklonaler Antikörper, Hase  | Cell Signalling Technologies |
| CDK4 monoklonaler Antikörper, Maus  | Cell Signalling Technologies |
| CDK7 monoklonaler Antikörper, Maus  | Cell Signalling Technologies |
| CDK9 monoklonaler Antikörper, Hase  | Santa Cruz Biotechnology     |
| Actin monoklonaler Antikörper, Hase | Sigma-Aldrich Chemie GmbH    |

#### 4.8.4 Verwendete Softwareprogramme

|                |  |
|----------------|--|
| CalcuSyn 2.0   | Biosoft (Cambridge, UK)                      |
| Cellquest      | Bekton Dickenson (Mountain View, CA, USA)    |
| ModFit LT      | Verity Software House (Topsham, ME, USA)     |
| MS-Office 2002 | Microsoft (Redmond, WA, USA)                 |
| TINA 2.0       | Raytest GmbH (Straubenhardt, Ba-Wü, Germany) |
| SigmaPlot 2000 | SPSS Incorporated (Chicago, IL, USA)         |
| Irfanview      | Irfan Skiljan                                |
| WinMDI 2.8     | Joseph Trotter                               |

#### 4.8.5 Verwendete Geräte

|                           |  |
|---------------------------|--|
| Durchflußzytometer:       | BD Biosciences (Palo Alto, CA, USA)    |
| BD FACS Calibur           |  |
| ELISA-Reader: Optimax pro | Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA) |
| Vi-Cell: AS               | Beckmann Coulter (Fullerton, CA, USA)  |

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Flavopiridol

#### 5.1.1 Dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung durch Flavopiridol

Die Proliferationsassays mit Flavopiridol wurden analog zu den oben beschriebenen Versuchen mit Bendamustin durchgeführt, wobei Z-138, Granta 519, JVM-2 und Karpas 422 mittels Vi-Cell (800nM, 400nM, 200nM, 100nM, 50nM), Jeko-1, NECB-1, HBL-2 und Jurkat (800nM, 600nM, 400nM, 300nM, 200nM, 100nM, 50nM) mittels konventionellem Trypanblau-Ausschlusstest nach 24h und 48h ausgewertet wurden. Um die Vergleichbarkeit dieser zwei Methoden zu gewährleisten, wurde in Pilotexperimenten eine übereinstimmende Genauigkeit beider Methoden nachgewiesen. Hierbei unterschieden sich die gemessenen absoluten Zellzahlen der beiden Methoden in je drei unabhängigen Experimenten mit Jeko-1 und NCEB-1 um insgesamt  $6\pm 0,8\%$ .

Es konnte anhand dieser Versuche eine zeit- und dosisabhängige Proliferationshemmung durch Flavopiridol nachgewiesen werden, jedoch mit deutlichen Unterschieden im Dosis-Wirkungsprofil innerhalb der MCL-Zelllinien:

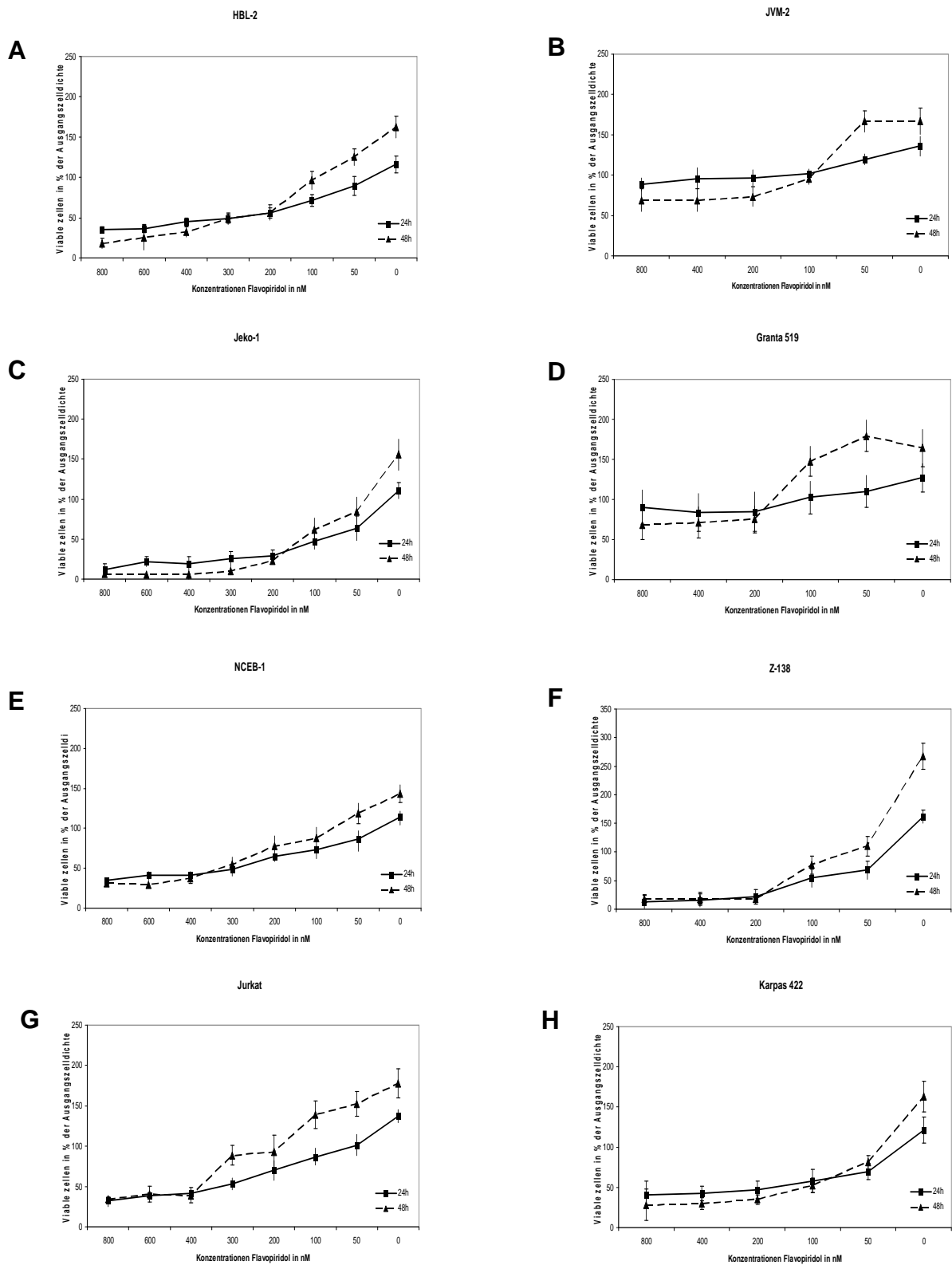
Jeko zeigte bei der höchsten verwendeten Dosis von 800nM nach 24h eine Viabilität von 12%, nach 48h 7%, wohingegen Granta 519 mit 90% nach 24h und 68% Viabilität nach 48h relativ zur Ausgangszellichte die unempfindlichste der untersuchten MCL-Zelllinien war. Vergleicht man die Wirkung von Flavopiridol anhand dieser beiden Zelllinien bei der niedrigsten gewählten Konzentration von 50nM, zeigt sich nahezu kein Effekt nach 48h bei Granta 519 (179%), wobei Jeko-1 mit 80% respektive zum Ausgangswert einen klaren Effekt dieser niedrigen Flavopiridol-Dosierung beweist und somit als sensitivste untersuchte Zelllinie betrachtet werden kann.

Anhand der experimentellen Inklusion der Kontrollzelllinien Jurkat und Karpas 422 ließ sich eine MCL-spezifische Wirkung von Flavopiridol nicht nachweisen: Die ermittelten Werte dieser beiden Zelllinien lagen innerhalb (Jurkat:  $32,4\pm 6,7\%$ ;  $33,9\pm 2,9\%$  und Karpas 422:  $40,5\pm 17,1\%$ ;  $28,5\pm 19\%$ ) der MCL-Zelllinien, zeigten jedoch eine unterschiedliche Sensitivität auf Flavopiridol.

Betrachtet man das Verhältnis von Dosierung, Zeitpunkt und Zellzahlen, zeigt sich,

dass Flavopiridol in hohen Konzentrationen einen prolongierten negativen Effekt auf die Viabilität nach 48h hat, verdeutlicht anhand des Unterkreuzens der 48h Kurven unter die 24h Kurven (Abbildung 6).

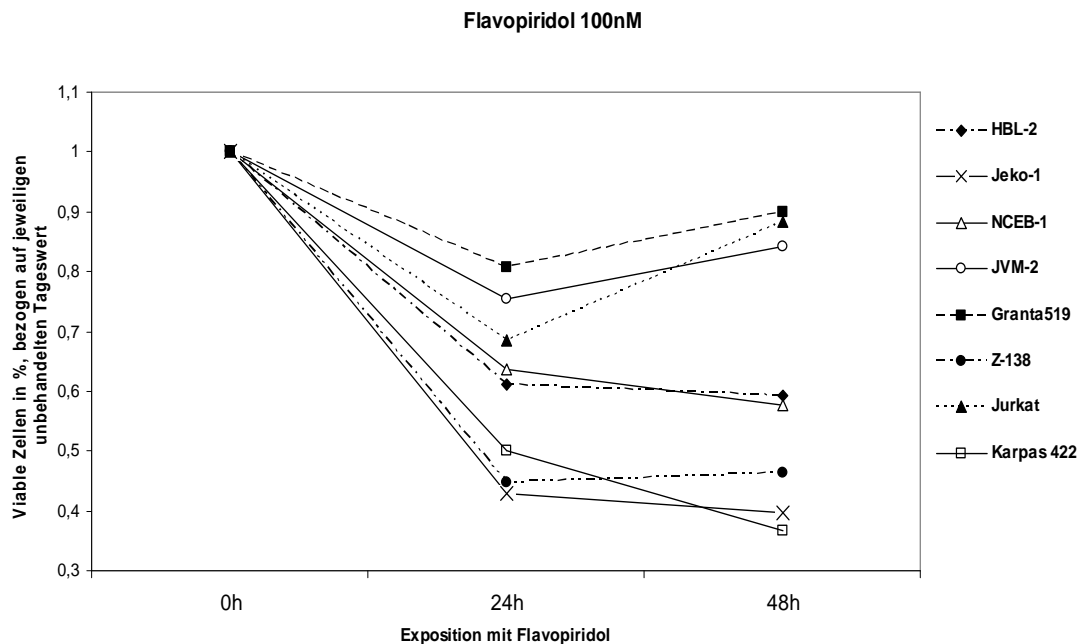
Andererseits zeigt sich bei den niedrigen Konzentrationen ein klarer Anstieg der absoluten Zellzahlen auch nach 48h, was möglicherweise auf einen Abbau des Wirkstoffs hinweist und folglich zu einer erneuten Proliferation der Zellen führt. Bei den resistenten Zellreihen JVM-2 und Granta 519 war bei keiner Dosierung eine signifikante Erniedrigung der Zellzahlen nach 24h zu erreichen, lediglich war eine Proliferationsverlangsamung dieser Zellreihen zu beobachten.



**Abbildung 6: Wachstumskurven nach 24 und 48 Stunden**

Mantelzelllymphom- und Kontrollzelllinien wurden in einer Zelldichte von  $0,5 \times 10^6$ /ml ausgesät und 48 Stunden mit Flavopiridol inkubiert. Nach 24 und 48 Stunden wurde die Viabilität mittels Trypanblau-Ausschluß-Test und Vi-Cell Analysen bestimmt. HBL-2 (A), JVM-2 (B), Jeko-1 (C), Granta 519 (D), NCEB-1 (E), Z-138 (F), Jurkat (G) und Karpas 422 (H) Durchgezogene Linien repräsentieren gemessene Werte nach 24 Stunden, gestrichelte Linien nach 48 Stunden.

Aufgrund unterschiedlicher Zellverdoppelungszeiten und sich somit stark unterscheidenden Wachstumsgeschwindigkeiten ist obige Darstellung der Werte mit Bezug auf den Ausgangswert nur bedingt geeignet für einen direkten Vergleich der antiproliferativen Wirkung von Flavopiridol auf die verschiedenen Zellreihen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden daher die Zellzahlen nach Behandlung mit 100nM Flavopiridol auf den jeweiligen unbehandelten Wert bei 24 und 48 Stunden bezogen.



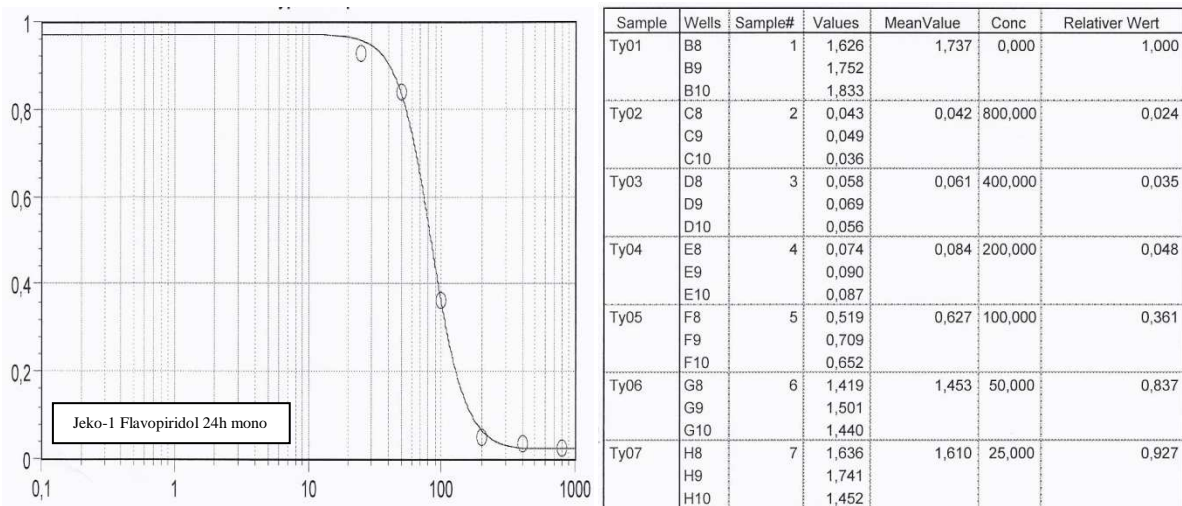
**Abbildung 7: Vergleich der Wachstumskurven bei 100nM Flavopiridol:**

Prozent viable Zellen bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert der unbehandelten Zellen (100%) bei 24 und 48 Stunden mit 100nM Flavopiridol

Abbildung 7 zeigt, dass Jeko-1 (42% viable Zellen nach 24h; 39% nach 48h), Z-138 (44%; 46%) und Karpas 422 (50%; 36%) die empfindlichsten, Granta 519 (81%; 91%) JVM-2 (75%; 84%) und Jurkat (68%; 88%) unempfindlichere Zelllinien sind. Der antiproliferative Effekt von Flavopiridol unterscheidet sich im direkten Vergleich zwischen der sensitivsten und resistentesten Zellreihe stark, mit Unterschieden der jeweiligen Zellzahlen von bis zu 39% nach 24 und 55% nach 48 Stunden. Die folliculäre-Lymphom Zelllinie Karpas 422 zeigte nach 48h die höchste Apoptoserate von allen untersuchten Zelllinien (68%). Eine spezifische Sensitivität auf Flavopiridol von MCL lässt sich trotz der relativen Resistenz von der T-ALL Zelllinie Jurkat daher nicht nachweisen.

### 5.1.2 WST-1 IC<sub>50</sub> Werte nach Flavopiridol

Für Flavopiridol wurden mittels WST-1 anhand oberer Beschreibung folgende IC<sub>50</sub> Werte ermittelt: NCEB-1 (393±60,1), Jurkat (248,2±32,5) HBL-2 (183,4±30,8) und Jeko-1 mit 69,9±6,5 nM. Für Granta 519 war der IC<sub>50</sub> Wert nicht im titrierten Bereich und konnte folglich nicht bestimmt werden. Granta519 stellt somit die resistensteste untersuchte Zelllinie. NCEB-1 zeigte im Vergleich zu der sensitivsten Zelllinie Jeko-1 einen 5.7 und zu Jurkat einen 1.6 fach höheren IC<sub>50</sub> Wert. Auch hier lassen sich die 5 mittels WST-1 untersuchten Zelllinien in Gruppen verschiedener Empfindlichkeiten einteilen: Zum einen NCEB-1 und Granta 519 als resistensteste, HBL-2 und Jurkat als intermediär, und Jeko-1 als empfindlichste Zelllinien. Die ermittelten IC<sub>50</sub> Werte bestätigen die in den Proliferationsassays erhobenen Daten.

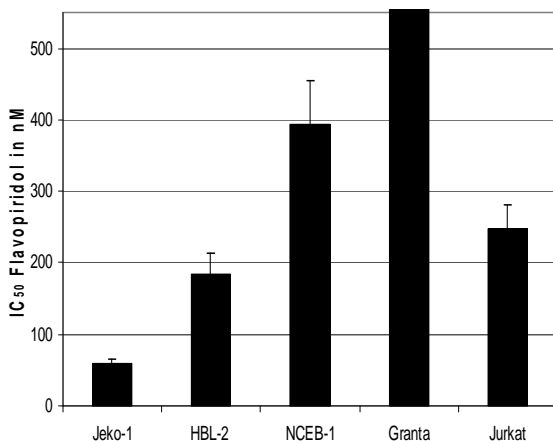


**Abbildung 8: WST-1 Auswertung mittels Elisa-Reader**

Exemplarische Elisa-Auswertung mittels SigmaPlot2000 einer WST-1 Analyse 24h nach Behandlung von Jeko-1 mit Flavopiridol. Die linke Grafik (x-Achse: viable Zellen in Prozent; y-Achse: applizierte Dosis) zeigt die Dosis-Wirkungskurve und kalkulierte IC-Werte.

In der Rechten Abbildung sind die Rohdaten der einzelnen Experimente aufgeführt: Typ 01 entspricht den unbehandelten Kontrollen, Typ 02-07 den Exstinktionen der unterschiedlichen Dosierungen.

In der Rechten Spalte sind die relativen Werte bezogen auf die Kontrolle angegeben.

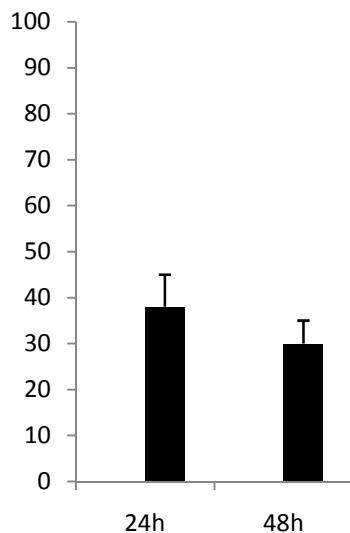


**Abbildung 9: IC<sub>50</sub> Werte für Flavopiridol:**

Dargestellte Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen

### 5.1.3 Apoptose Detektion mit Annexin V-PE und 7-AAD-Färbung

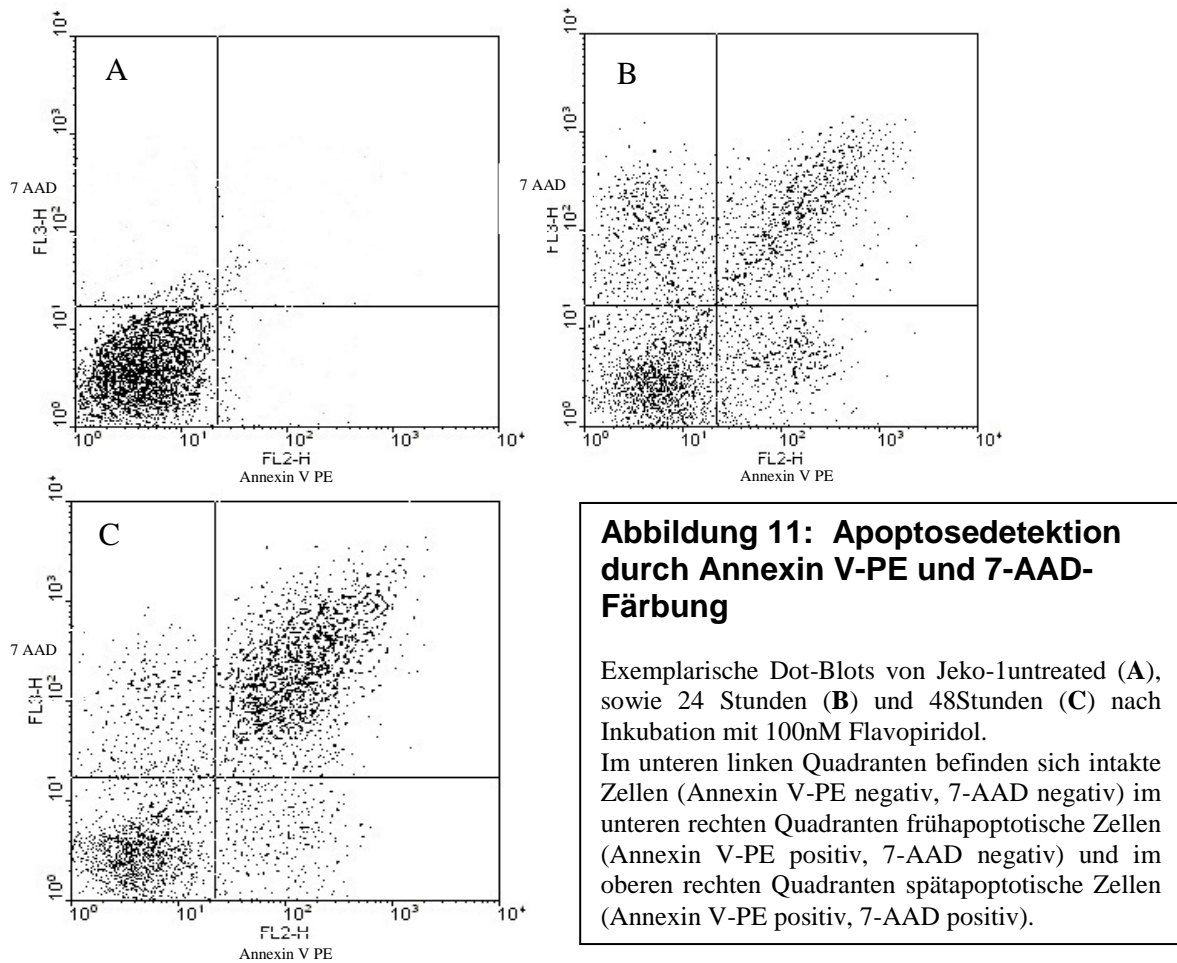
Flavopiridol kann, wie Eingangs schon erwähnt, in einer Vielzahl von Zelllinien unterschiedlichster Tumorentitäten Apoptose induzieren. Die nach den initialen 48 Stunden Zellkulturexperimenten und der IC<sub>50</sub> Bestimmung festgelegte Konzentration von 100nM Flavopiridol wurde nun herangezogen, um das Ausmaß der durch Flavopiridol bewirkten Apoptose in der empfindlichen MCL-Zelllinie Jeko-1 zu bestimmen. Zu diesem Zwecke wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 0,5x10<sup>6</sup>/ml ausgesät und der Grad der apoptotischen Zellen zum Zeitpunkt 0, d.h. vor Behandlung, sowie 24 und 48 Stunden danach durchflußzytometrisch analysiert. Anhand der Doppelfärbung mit Annexin V-PE und 7-AAD konnte in den Versuchen zwischen den Populationen von früh- und spätapoptischen Zellen unterschieden werden und durch die Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation auch deren zeitlicher Verlauf bestimmt werden. Jeko-1 wies nach Behandlung mit Flavopiridol über 24 bzw. 48 Stunden einen Anteil an nicht-apoptotischen Zellen zwischen 37% (±7%) und 29% (±5%) bezogen auf die Gesamtzahl der zum Zeitpunkt 0 lebenden Zellen auf.



#### **Abbildung 10: Apoptoseinduktion in Jeko-1 Zellen nach Flavopiridol**

Jeko-1 Zellen wurden über 24 und 48 Stunden mit 100nM Flavopiridol inkubiert. Apoptose wurde zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 Stunden durchflußzytometrisch bestimmt. Gezeigt ist der Anteil der nicht-apoptotischen Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der nicht-apoptotischen Zellen zum Zeitpunkt 0. Jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.





## 5.1.4 Auswirkungen von Flavopiridol auf den Zellzyklus

### 5.1.4.1 Änderungen des Zellzyklusprofils nach Exposition mit Flavopiridol

Um den Mechanismus der antiproliferativen Wirkung von Flavopiridol auf MCL-Zelllinien weiter zu untersuchen, wurden Zellzyklus-Analysen mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt. Ziel dieser Versuche war die Beantwortung der Frage, in welcher Form Flavopiridol eine Zellzyklusdysregulation bewirkt und wie stark diese von der Zeit und der Dosis abhängig ist. Die Analyse wurde vier, 24 und 48 Stunden nach Behandlung mit 50, 100 und 200nM Flavopiridol durchgeführt. Verwendete MCL-Zellreihen waren Jeko-1, Granta 519, HBL-2, NCEB-1 und als Kontroll-Zelllinie Jurkat.

Nach Behandlung mit 100 und 200 nM Flavopiridol war ein Anstieg im Sub-G1-Bereich als Marker für apoptotische Nuclei in allen Versuchen zu beobachten. Dieser Bereich ist allerdings nicht der eigentlichen Zellzyklusregulation zuzuordnen und geht daher nicht in die Berechnung der Zellzyklusphasen ein. Der 4 Stunden-Zeitpunkt wurden gewählt, um etwaige frühe Ereignisse im Zellzyklusprofil zu detektieren. Die Messungen nach 24 und 48 Stunden wurden mit den bereits diskutierten

Ergebnissen aus den Proliferationsversuchen korreliert. Nach 4 Stunden Inkubation mit Flavopiridol war bei keiner Dosierung ein Effekt auf die Zelllinien NCEB-1 und Granta 519 zu erkennen, lediglich Jeko-1 und HBL-2 reagierten in den beiden höchsten Konzentrationen mit einer 10 prozentigen Abnahme der S-Phase.

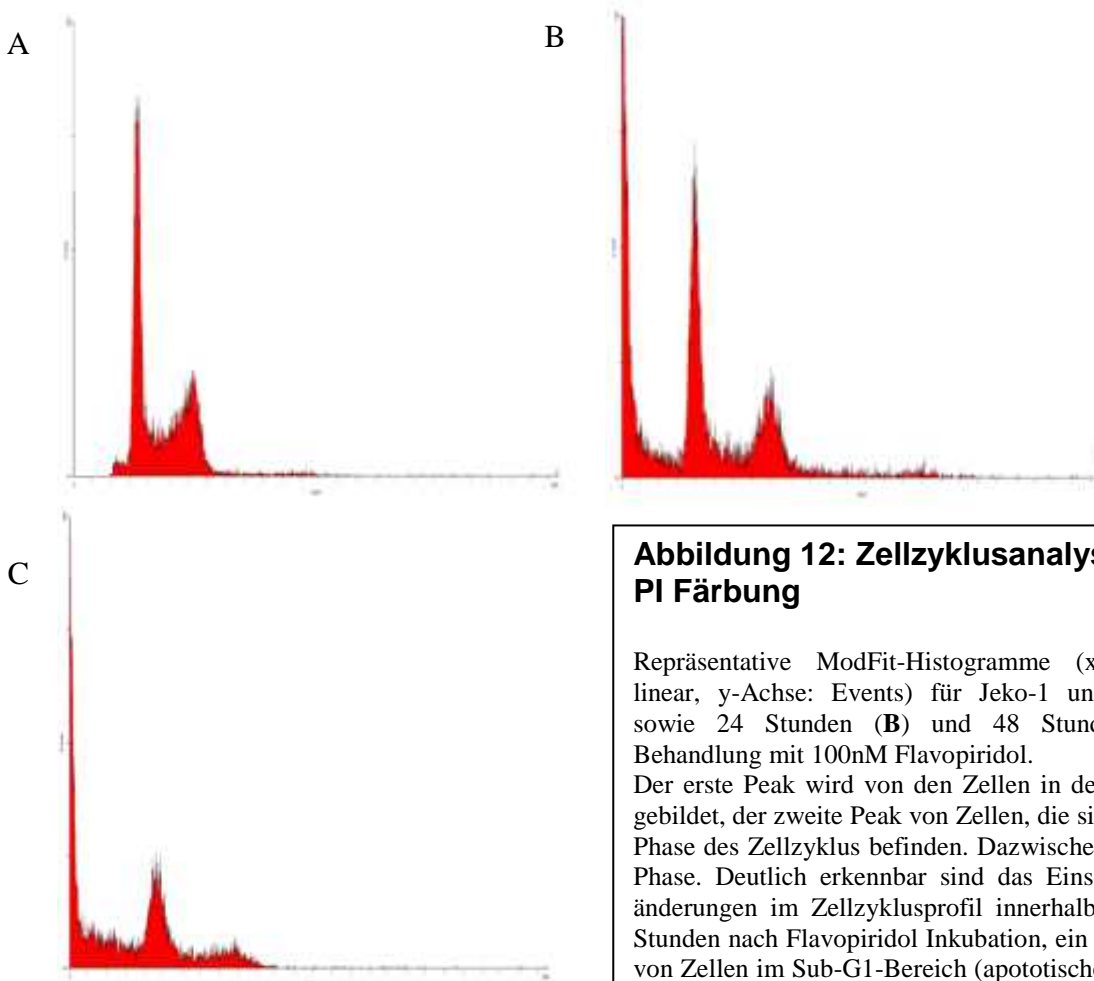
Nur in HBL-2 und Jeko-1 konnte nach 4 Stunden Exposition leichte Veränderungen des Zellzyklus nach Behandlung mit Flavopiridol gezeigt werden, jedoch keinen effektiven Zellzyklusarrest. Somit scheint Flavopiridol erst nach einer längeren Inkubationszeit einen Effekt auf die Zellen zu haben.

#### **5.1.4.2 Flavopiridol bewirkt einen dosis- und zeitabhängigen G1/S und G2/M Arrest**

Betrachtet man die prozentuale Entwicklung der Zellzyklusphasen in Relation zu der jeweiligen unbehandelten Kontrolle, zeigt sich, dass alle Zelllinien nach 24 und 48 Stunden Behandlung einer dosis- und zeitabhängigen Verringerung der S-Phase bei gleichzeitiger Erhöhung der G1-Phase unterliegen. Diese Ergebnisse sprechen für einen von Flavopiridol bewirkten, durch die Dosis steigerbaren G1/S Arrest, welcher nur bei Jurkat nach 48h nachlässt. Die stärksten Verschiebungen zeigten sich bei Jeko-1 (nach 48 Stunden und 200nM eine Verringerung der S-Phase um 39% bei gleichzeitigem Anstieg der G1/G0 Phase um 24%), der geringste Effekt war bei Granta 519, mit einer S-Phasen Reduktion von 17% und G1/G0 Anstieg von 19% nach 48h, zu beobachten (Abbildung 8).

Somit scheint die Induktion eines Zellzyklusarrests in direkten Zusammenhang mit der individuellen Empfindlichkeit der Zellen auf Flavopiridol zu stehen und weist eine starke Korrelation mit in den Proliferationsassays erhobenen Daten auf. So erwies sich Jeko-1 als Zelllinie mit dem niedrigsten ermittelten  $IC_{50}$  bei gleichzeitig stärkstem nachgewiesenen G1/S Zellzyklusarrest. Jurkat als T-Zell-Kontrolle zeigte ebenfalls eine Verschiebung des G1/S Quotienten im Sinne eines Arrests, jedoch ließ bei dieser Zelllinie die Wirkung nach 48 Stunden wieder nach und war nur noch in der höchsten Konzentration nachweisbar. Diese Beobachtung deckt sich ebenfalls mit den Proliferationsassays, da Jurkat die stärkste Repopulation der Zellzahlen bei niedrigen Konzentrationen nach 48 Stunden aufwies. Dies könnte auch darauf hinweisen, dass die Wirkung von Flavopiridol auf MCL-Zelllinien im Sinne einer Zyklusdysregulation länger besteht, als bei anderen Entitäten. Betrachtet man die prozentualen Veränderungen der in der G2/M Phase befindlichen Zellen, reagierten

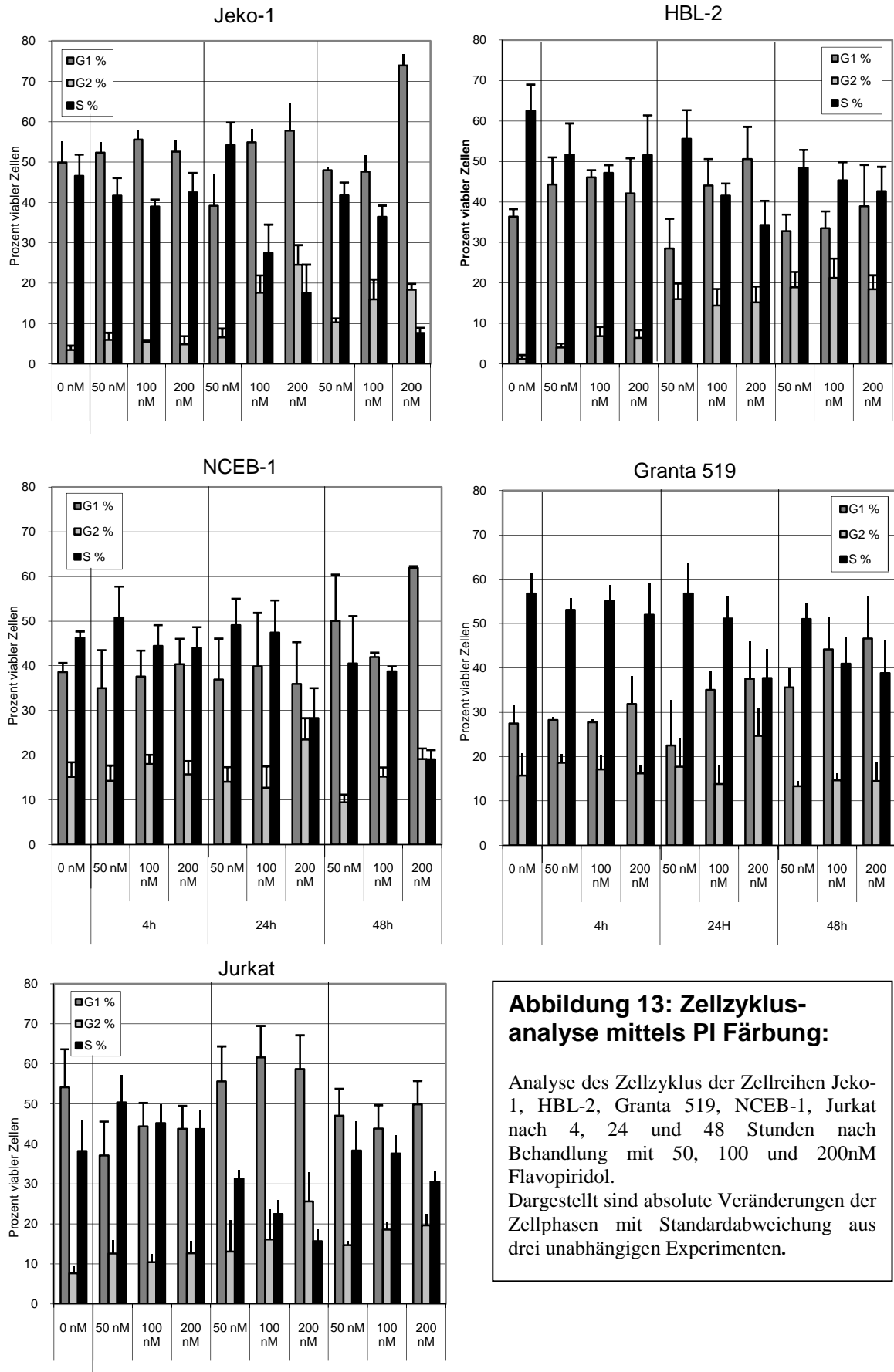
die mittels WST-1 und Trypanblau-Ausschlusstests als sensibel klassifizierten Zelllinien (Jeko-1, HBL-2 und Jurkat) mit einem dosis- und zeitabhängigen Anstieg dieser Population von bis zu 23%. Bei Granta 519 und NCEB-1 waren diese Effekte mit maximal 8% viel geringer ausgeprägt. Somit scheint die antiproliferative Reaktion auf Flavopiridol in direkten Zusammenhang mit einem G2/M Arrest zu stehen.



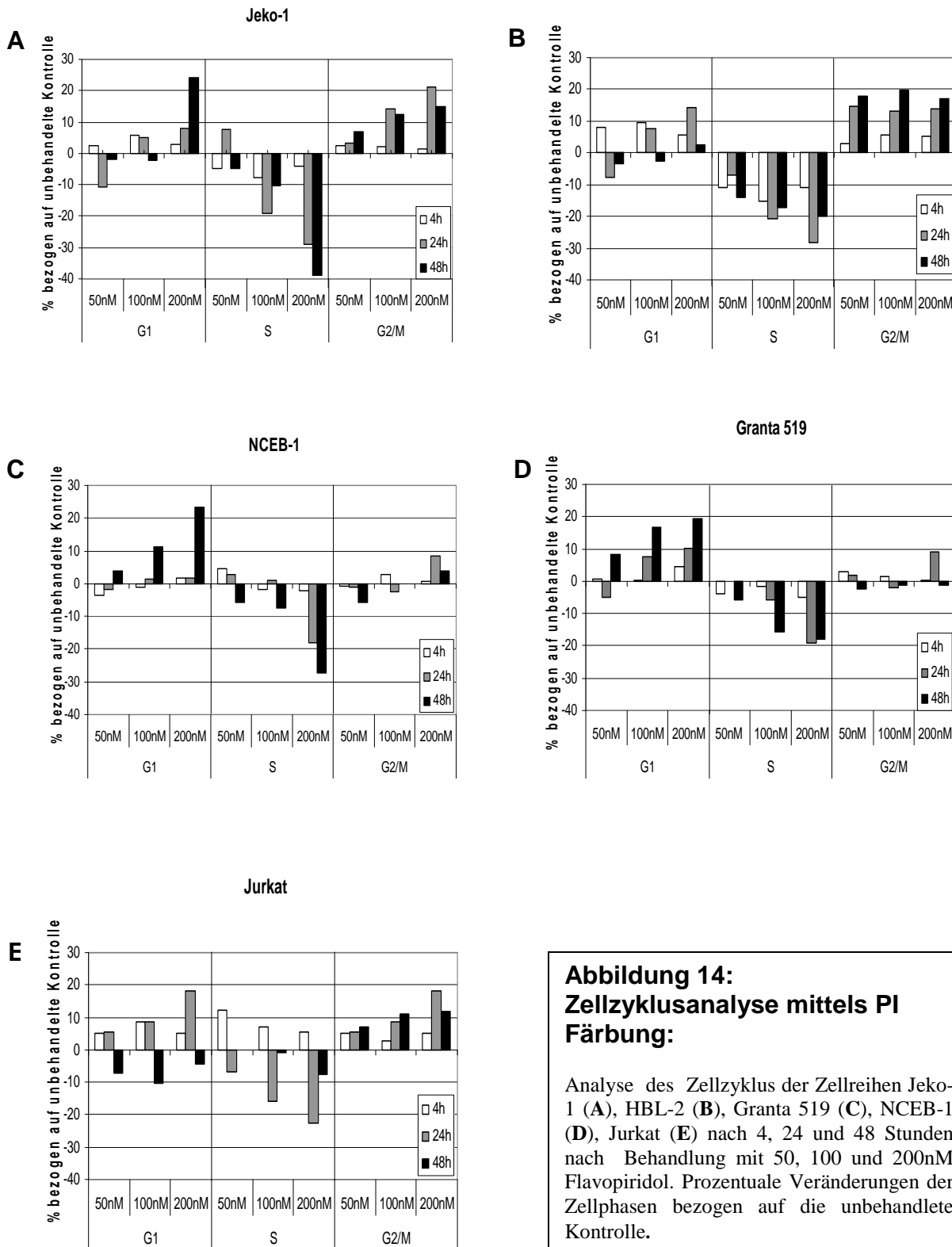
**Abbildung 12: Zellzyklusanalyse mittels PI Färbung**

Repräsentative ModFit-Histogramme (x-Achse: FL-2 linear, y-Achse: Events) für Jeko-1 unbehandelt (**A**), sowie 24 Stunden (**B**) und 48 Stunden (**C**) nach Behandlung mit 100nM Flavopiridol.

Der erste Peak wird von den Zellen in der G0/G1-Phase gebildet, der zweite Peak von Zellen, die sich in der G2/M Phase des Zellzyklus befinden. Dazwischen Zellen der S-Phase. Deutlich erkennbar sind das Einsetzen der Veränderungen im Zellzyklusprofil innerhalb der ersten 24 Stunden nach Flavopiridol Inkubation, ein starker Anstieg von Zellen im Sub-G1-Bereich (apoptische Zellen) sowie eine zunehmende Verschiebung des Zellzyklus zur G1 Phase mit starker Abnahme der viablen Zellen in der S-Phase, vereinbar mit einem G1/S-Arrest.



**Abbildung 13: Zellzyklus-analyse mittels PI Färbung:**  
 Analyse des Zellzyklus der Zellreihen Jeko-1, HBL-2, Granta 519, NCEB-1, Jurkat nach 4, 24 und 48 Stunden nach Behandlung mit 50, 100 und 200nM Flavopiridol. Dargestellt sind absolute Veränderungen der Zellphasen mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 14:**  
**Zellzyklusanalyse mittels PI**  
**Färbung:**

Analyse des Zellzyklus der Zellreihen Jeko-1 (A), HBL-2 (B), Granta 519 (C), NCEB-1 (D), Jurkat (E) nach 4, 24 und 48 Stunden nach Behandlung mit 50, 100 und 200nM Flavopiridol. Prozentuale Veränderungen der Zellphasen bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

### 5.1.5 Auswirkungen von Flavopiridol auf die CDK Expression

Um die Wirkung von Flavopiridol auf den Expressionslevel von CDKs zu untersuchen, wurden 4 CDKs (2, 4, 7 und 9) mit bekannter Inhibition durch Flavopiridol untersucht (Abbildung 12). Hierzu wurden die Zellreihen Jeko-1, HBL-2, NCEB-1 und Jurkat mit 100nM Flavopiridol behandelt, die Zellen nach vier und acht Stunden geerntet und die Blots anschließend mittels TINA 2.0 Software Programm analysiert. Betrachtet man die mittels Densitometrie quantifizierte Proteinexpression anhand der CDK/Actin-Ratio (Abbildung 9), zeigen sich für die einzelnen Zellreihen im Vergleich der unbehandelten Kontrolle folgende Ergebnisse:

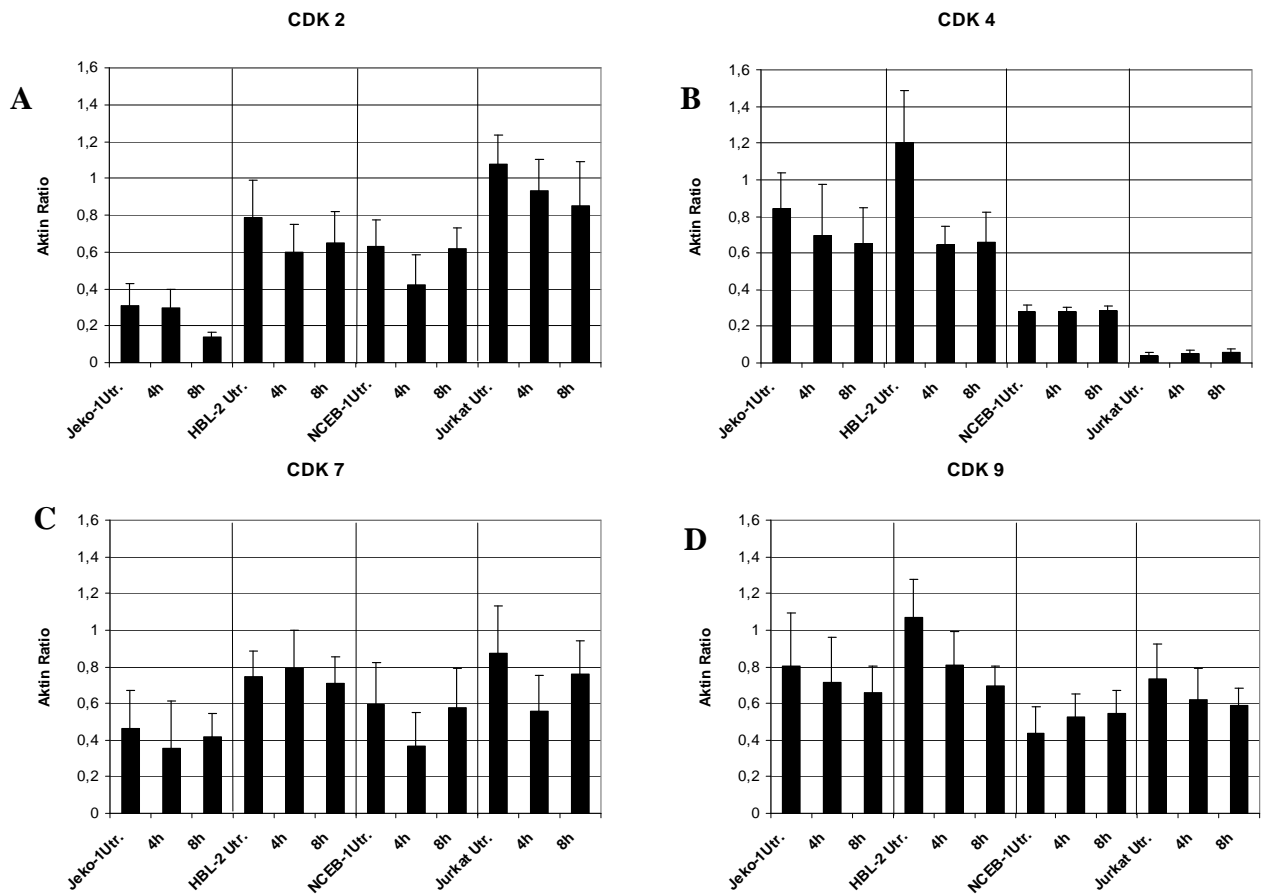
CDK2: Jeko-1 reagierte mit der stärksten Verringerung der CDK2-Expression (nach 8h war die gemessene Dichte noch  $44\pm 2\%$  des Ausgangswertes), in HBL-2 und Jurkat war eine leichte Abschwächung der Expression nachweisbar (HBL-2:  $82\pm 17\%$ ; Jurkat:  $78\pm 23\%$ ), in NCEB-1 nach 8h die Bandendichte des Ausgangswertes von CDK2 wieder erreicht ( $98\pm 0,29\%$ , CDK2/Actin-Ratio untreated  $0,63\pm 0,17$ ).

Die CDK4 Expression nach Behandlung mit Flavopiridol wurde folgendermaßen alteriert: 8h nach Behandlung zeigte Jeko-1 einen mäßigen ( $77\pm 19\%$ ; CDK4/Actin-Ratio utr:  $0,84\pm 0,1$ ), HBL-2 bereits nach 4h einen starken Rückgang ( $54\pm 15\%$ ; CDK4/Actin-Ratio utr:  $1,2\pm 0,3$ ) der Proteinexpression. NCEB-1 zeigte keinerlei Veränderungen der Proteinbanden weder 4h oder 8h nach Behandlung ( $102\pm 2,7\%$  8h; CDK4/Actin-Ratio utr:  $0,26\pm 0,025$ ). Jurkat hingegen zeigte mit dem verwendeten CDK4-Antikörper keinerlei Banden.

Die gemessene Bandendichte von CDK7 zeigte nach 8h bei Jeko-1 und HBL-2 kaum Veränderungen (Jeko-1:  $90\pm 14\%$ ; HBL-2:  $94\pm 21\%$ ), NCEB-1 und Jurkat zeigten einen temporären Einbruch der Werte nach 4h auf 60%, jedoch erreichten die Werte nach 8h wieder das Niveau der Ausgangswerte ( NCEB-1:  $97\pm 22\%$ ; Jurkat:  $88\pm 21\%$ ).

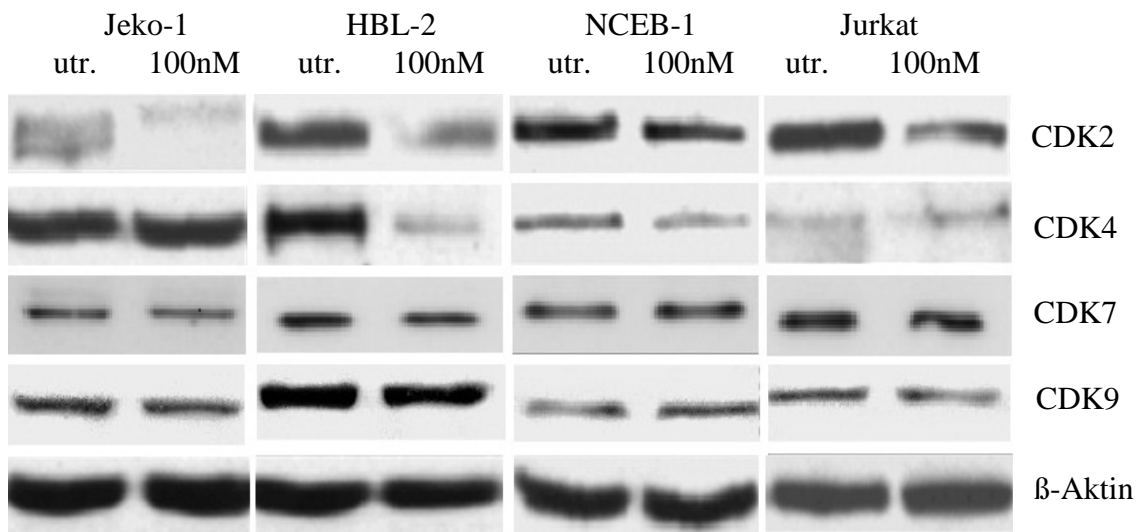
Der Einfluss von Flavopiridol auf die Expression von CDK9 zeigte nach 8h in Jeko-1 ( $89\pm 24\%$ ) und in Jurkat ( $80\pm 9\%$ ) einen geringen Rückgang. Die Bandendichte von HBL-2 zeigte nach 8h den stärksten prozentualen Rückgang aller untersuchten Zellreihen ( $65\pm 11\%$ ). Die Ergebnisse für NCEB-1 zeigten eine Steigerung der CDK9 Expression nach Behandlung mit Flavopiridol. Nach 8 Stunden waren die relativen Werte auf  $123\pm 21\%$  des Ausgangswertes erhöht.

## Ergebnisse



### Abbildung 15: Veränderung der Proteinexpression nach Behandlung mit 100nM Flavopiridol:

Die Zelllinien Jeko-1, HBL-2, NCEB-1 und Jurkat wurden auf die Expression von CDK-2 (A), CDK-4 (B), CDK-7 (C) und CDK-9 (D) vier und acht Stunden nach Behandlung mit 100nM Flavopiridol untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung.



### Abbildung 16: Western-Blot Analysen

Repräsentative Ergebnisse einer Western-Blot Analyse mit CDK-2, CDK-4, CDK-7, CDK-9 sowie β-Aktin als Kontrolle. Dargestellt ist jeweils die unbehandelte Kontrolle und mit 100nM behandelte Zellen 8h nach Inkubation mit Flavopiridol.

## 5.2 Bendamustin

### 5.2.1 Bendamustin bewirkt eine dosis- und zeitabhängige Verringerung der Zellzahlen

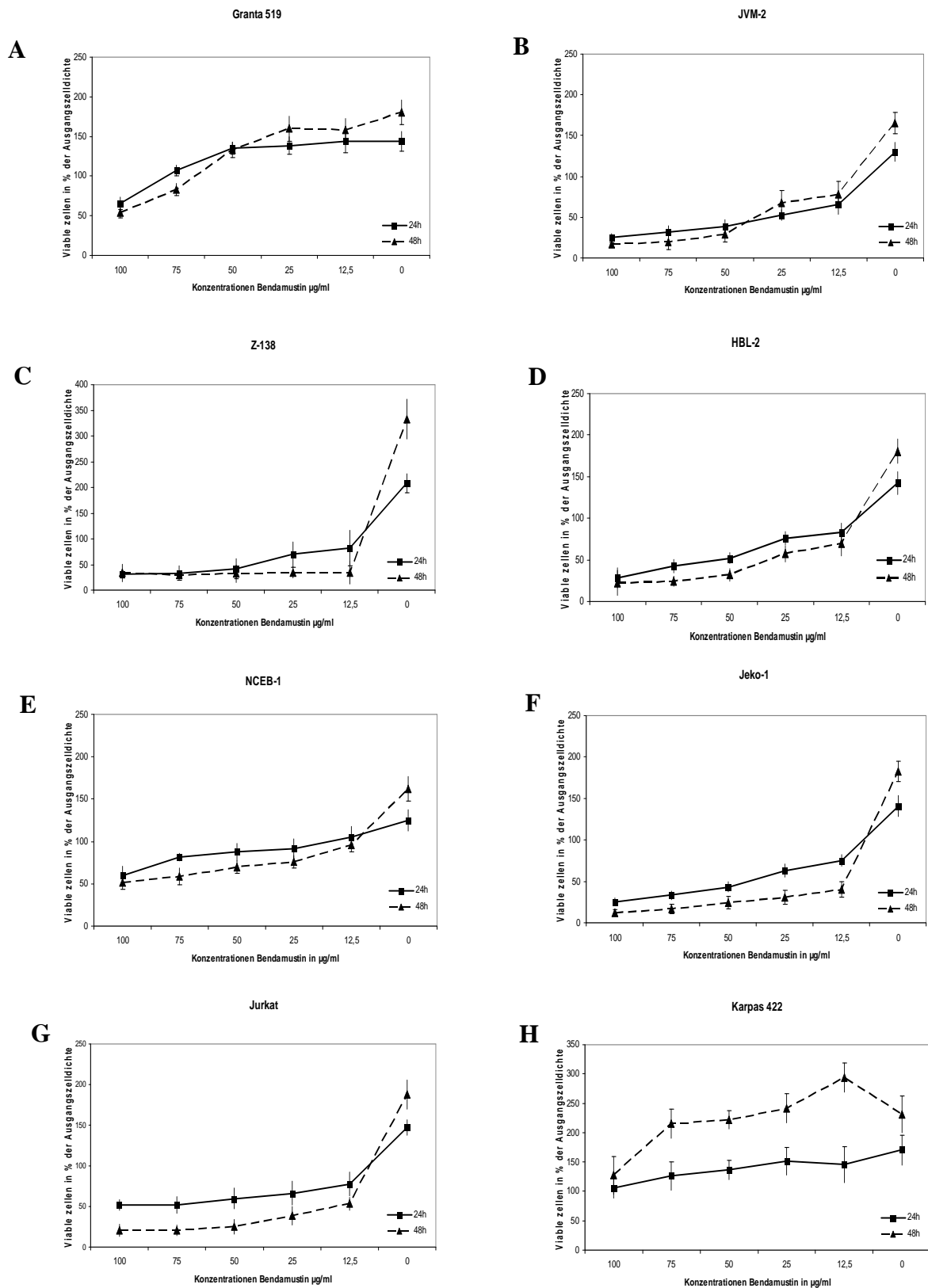
Initial wurden die MCL-Zelllinien HBL-2, Jeko-1, JVM-2, NCEB-1, Granta 519, Z-138 und die Kontroll-Zelllinien Jurkat und Karpas 422 auf die antiproliferative Wirkung von Bendamustin nach 48-stündiger Exposition untersucht. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $0,5 \times 10^6$ /ml ausgesät und mit 100, 75, 50, 25 und 12,5 µg/ml inkubiert, wobei Z-138, Granta 519 und Karpas 422 mittels Vi-Cell, Jeko-1, NCEB-1, HBL-2 und Jurkat mittels konventionellem Trypanblau-Ausschlusstest nach 24h und 48h ausgewertet wurden.

Betrachtet man die Kurven in Abbildung 10, ist eine dosis- und zeitabhängige Verringerung der Zellzahlen in allen MCL-Zelllinien ersichtlich, jedoch mit großen Unterschieden zwischen den Zelllinien. Bei der höchsten untersuchten Dosis von 100µg/ml zeigten sich nach 24 und 48 Stunden Jeko-1 ( $25,5 \pm 4\%$  bei 24h;  $12 \pm 4\%$  bei 48h) viabler Zellen relativ zur Ausgangszellwert), JVM-2 ( $25 \pm 4,7\%$ ;  $16,6 \pm 2,3\%$ ), HBL-2 ( $27 \pm 7,5\%$ ;  $22,3 \pm 6,5\%$ ) und Z-138 ( $31,9 \pm 7,9\%$ ;  $33,8 \pm 7,1\%$ ) als sensitive Gruppe, Granta 519 ( $65,6 \pm 7,8\%$ ;  $53,8 \pm 6,4\%$ ) und NCEB-1 ( $59,3 \pm 11,2\%$ ;  $51,9 \pm 8,3\%$ ) als relativ unempfindliche Zellreihen.

Bendamustin erreichte bei Granta 519 im Gegensatz zu NCEB-1 nur in der höchsten Dosierung eine leichte Verringerung der Zellzahl und zeigte als einzige MCL-Zelllinie eine Repopulation bei 50µg/ml nach 48h. Jurkat ( $51,8 \pm 6,8\%$ ;  $20,1 \pm 7,7\%$ ) zeigte ein moderates Ansprechen auf Bendamustin, wohingegen Karpas ( $106 \pm 16,3\%$ ,  $127,6 \pm 31,3\%$ ) lediglich mit einer verlangsamten Proliferationsrate reagierte und somit die resistenteste untersuchte Zellreihe ist. Für alle MCL-Zelllinien erwies sich eine längere Inkubationsdauer effektiver als eine erhöhte Dosierung: so lag in HBL-2 bei 50µg/ml nach 48 Stunden dieselbe Zellzahl wie bei 100µg/ml nach 24h vor, bei Z-138, Jeko-1 und Jurkat war der zeitgebundene Effekt am stärksten ausgeprägt. Hier erzielten 12,5µg/ml nach 48h Inkubation denselben Effekt wie 100µg/ml nach 24 Stunden. Den geringsten zeitabhängigen Effekt wurden für die relativ resistenten Zelllinien Karpas 422 und Granta 519 nachgewiesen.



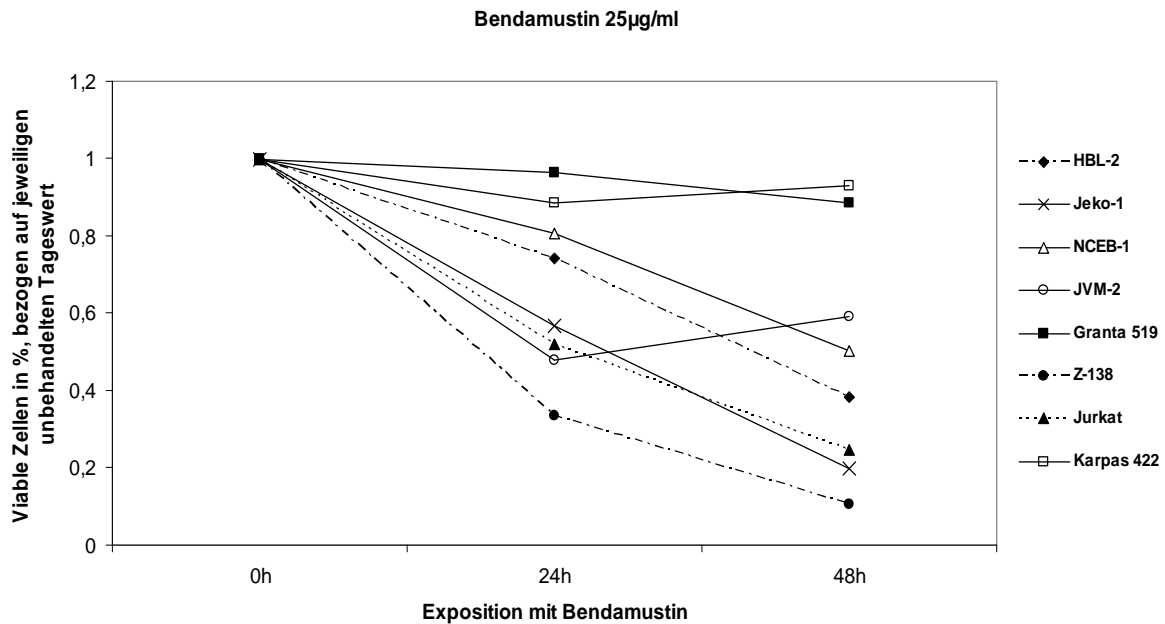
# Ergebnisse



**Abbildung 17: Wachstumskurven nach 24 und 48 Stunden Bendamustin**

Dargestellte Kurven der Zellreihen Jeko-1 (A), HBL-2 (B), Granta 519 (C), NCEB-1 (D), JVM-2 (E), Z-138 (F), Karpas 422 (H) und Jurkat (I) zeigen Prozent viabler Zellen bezogen auf die Ausgangszell-dichte nach Behandlung mit 100, 75, 50, 25 und 12,5 µg/ml Bendamustin.

Aufgrund unterschiedlicher Zellverdopplungszeiten und sich somit stark unterscheidenden Wachstumsgeschwindigkeiten ist obige Darstellung der Werte mit Bezug auf den Ausgangswert nur bedingt geeignet für einen direkten Vergleich der antiproliferativen Wirkung von Bendamustin auf die verschiedenen Zellreihen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden daher die Zellzahlen nach Behandlung mit 25µg/ml auf den jeweiligen unbehandelten Wert bei 24 und 48 Stunden bezogen und so die Vergleichbarkeit vereinfacht.



**Abbildung 18: Vergleich der Wachstumskurven bei 25µg/ml Bendamustin:**

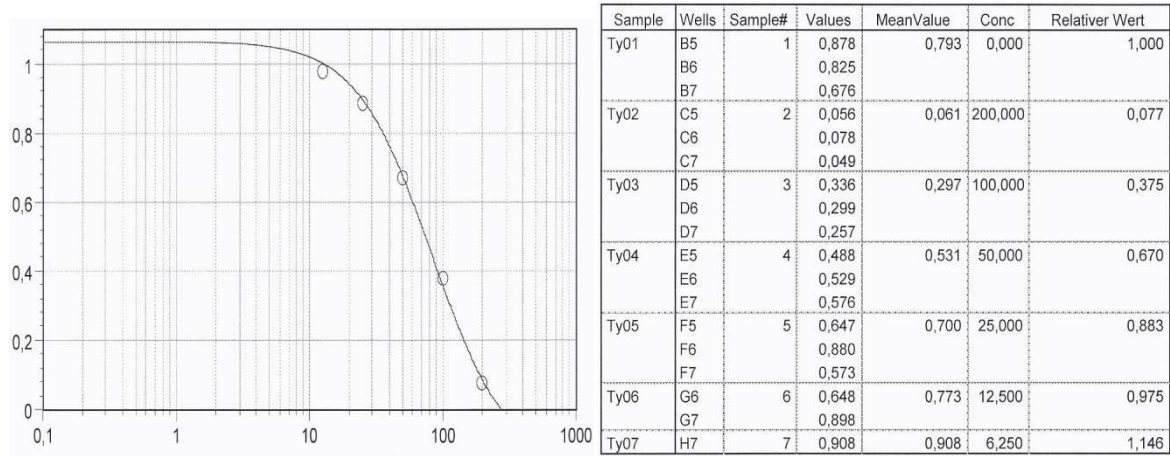
Prozent viabler Zellen bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert der unbehandelten Zellen (100%) jeweils 24 und 48 Stunden nach Inkubation mit 25µg/ml Bendamustin.

Hier wird deutlicher, dass Z-138 ( $33,5 \pm 4,5\%$  viable Zellen nach 24h;  $10 \pm 1,2\%$  nach 48h), JVM-2 ( $48 \pm 6,6\%$ ;  $59 \pm 4,9\%$ ), Jeko-1 ( $56,8 \pm 7,9\%$ ;  $19,7 \pm 6,3\%$ ) und Jurkat ( $52,1 \pm 4,5\%$ ;  $24,6 \pm 3,7\%$ ) die empfindlichsten, Granta 519 ( $96,4 \pm 12,2\%$ ;  $88,5 \pm 14,2\%$ ), Karpas 422 ( $88,7 \pm 17,8\%$ ;  $92,9 \pm 16,9\%$ ) und NCEB-1 ( $80,5 \pm 11,3\%$ ;  $50,2 \pm 7,8\%$ ) resistentesten Zelllinien sind. Der antiproliferative Effekt von Bendamustin unterscheidet sich stark, mit Unterschieden der jeweiligen Zellzahlen von bis zu 39% nach 24 und 55% nach 48 Stunden.

### **5.2.2 IC<sub>50</sub> Werte 24 Stunden nach Exposition mit Bendamustin unterscheiden sich innerhalb der untersuchten Zelllinien**

Um die antiproliferative Wirkung von Bendamustin auf die Zelllinien NCEB-1, Jeko-1, Granta 519, HBL-2 und Jurkat genauer zu definieren, wurden 24 Stunden nach Inkubation mittels WST-1 Assay IC<sub>50</sub>-Werte für die einzelnen Zellreihen ermittelt. Hierzu wurden 100µl der Zellen mit einer Zelldichte von 1x10<sup>6</sup>/ml in 96 Well-Platten ausgesät, mit einer Konzentration zwischen 0 und 100µg/ml Bendamustin über 24 Stunden inkubiert und anschließend ihre Proliferation mittels des kolorimetrischen WST-1 Essays analysiert. Um die Wirkung der Substanzen auf die Zellen besser zu vergleichen, wurde der IC<sub>50</sub>-Wert mittels SigmaPlot 2000 Software bestimmt. Der IC<sub>50</sub> definiert die Konzentration eines Stoffes, bei der die Stoffwechselaktivität der behandelten Zellen auf die Hälfte der unbehandelten Zellen abgesunken ist und somit auf die Proliferation rückschließen lässt. Betrachtet man die IC<sub>50</sub>-Werte der MCL Zellen für Bendamustin, zeigten sich stark unterscheidende Werte:

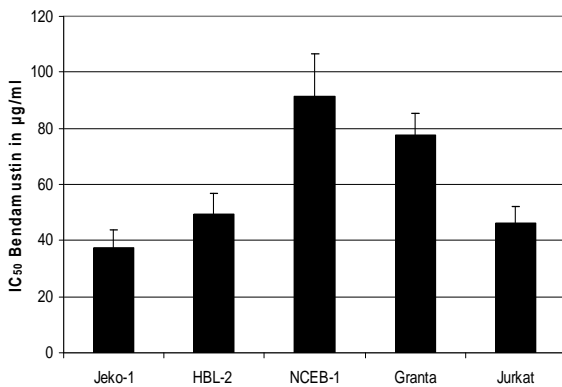
NCEB-1: 91,5±14,9, Granta 519: 77,5±7,8, HBL-2: 49,2±7,4 und Jeko-1: 37,4±6,3 µg/ml. NCEB-1 zeigte einen 2.5 fach höheren IC<sub>50</sub>-Wert als Jeko-1 und einen 1.2 fach höheren als Granta 519. Diese Ergebnisse bestätigen die initialen Trypanblau-Auszählungen: NCEB-1 und Granta 519 wurden mittels beider Methoden als die resistentesten, und Jeko-1 und HBL-2 als die sensitiven untersuchten Zelllinien charakterisiert. Somit lassen sich anhand der ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte die behandelten Zellreihen in zwei Gruppen unterteilen: Einerseits NCEB-1 und Granta 519, deren Ansprechen auf Bendamustin durchschnittlich schlechter als die der anderen Zelllinien war (84,5±9,8 µg/ml), und eine zweite Gruppe, bestehend aus Jeko-1 und HBL-2, deren IC<sub>50</sub>-Werte im Schnitt 44,3±6,1 µg/ml betragen. Jurkat, mit einem bestimmten IC<sub>50</sub> von 46,3±6,0 µg/ml, zeigte eine intermediäre Empfindlichkeit auf Bendamustin.



**Abbildung 19: WST-1 Auswertung Elisa-Reader Bendamustin**

Dargestellt ist eine exemplarische Elisa-Auswertung mittels SigmaPlot2000 einer WST-1 Analyse 24h nach Behandlung von NCEB-1 mit Bendamustin. Die linke Grafik (x-Achse: viable Zellen in Prozent; y-Achse: applizierte Dosis) zeigt die Dosis-Wirkungskurve.

In der Rechten Abbildung sind die Rohdaten der einzelnen Experimente aufgeführt: Typ 01 entspricht den unbehandelten Kontrollen, Typ 02-07 den Exstinktionen der unterschiedlichen Dosierungen.



**Abbildung 20: IC<sub>50</sub> Werte für Bendamustin**

Die Zellen wurden 24 Stunden mit 0 bis 100 µg/ml Bendamustin inkubiert. Die Balken repräsentieren errechnete Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

### **5.3 WST-1 Kombinationsassays**

Um die kombinierte Behandlung der Zellreihen Jeko-1, Granta 519, HBL-2, NCEB-1 und Jurkat mit Flavopiridol und Bendamustin, Flavopiridol und Bortezomib (ein potenter Proteasom-Inhibitor), und Bendamustin und Bortezomib auf potentielle synergistische oder antagonistische Effekte zu untersuchen, wurde eine Analyse der Interaktion zwischen den Einzelsubstanzen durchgeführt. Anhand der  $C_i$  ( $IC_{50}$ )-Werte wurden für jede Kombination der Effekt auf die Zellen nach 24 Stunden berechnet. (Tabelle 2)

#### **5.3.1 Die Kombination aus Flavopiridol und Bortezomib zeigt bei gleichzeitiger Inkubation antagonistische Effekte in allen Zellreihen**

Die  $C_i$ ( $IC_{50}$ )-Werte für die Kombination von Flavopiridol und Bendamustin zeigte in allen Zellreihen einen  $C_i$ ( $IC_{50}$ )-Wert, welcher auf einen antagonistischen Effekt dieser Kombination hinweist: HBL-2 ( $1,34 \pm 0,216$ ) und NCEB-1 ( $1,24 \pm 0,398$ ) zeigten mit  $C_i$ ( $IC_{50}$ )-Werten zwischen 1.1 und 1.45 einen leichten Antagonismus, Jeko-1 ( $1,82 \pm 0,554$ ) und Jurkat ( $1,56 \pm 0,293$ ) mit Werten über 1.45 einen Antagonismus für diese Kombination. Für Granta 519 konnten aufgrund der fehlenden  $IC_{50}$ -Werte für Flavopiridol in Monotherapie in diesen Versuchen keine Daten erhoben werden.

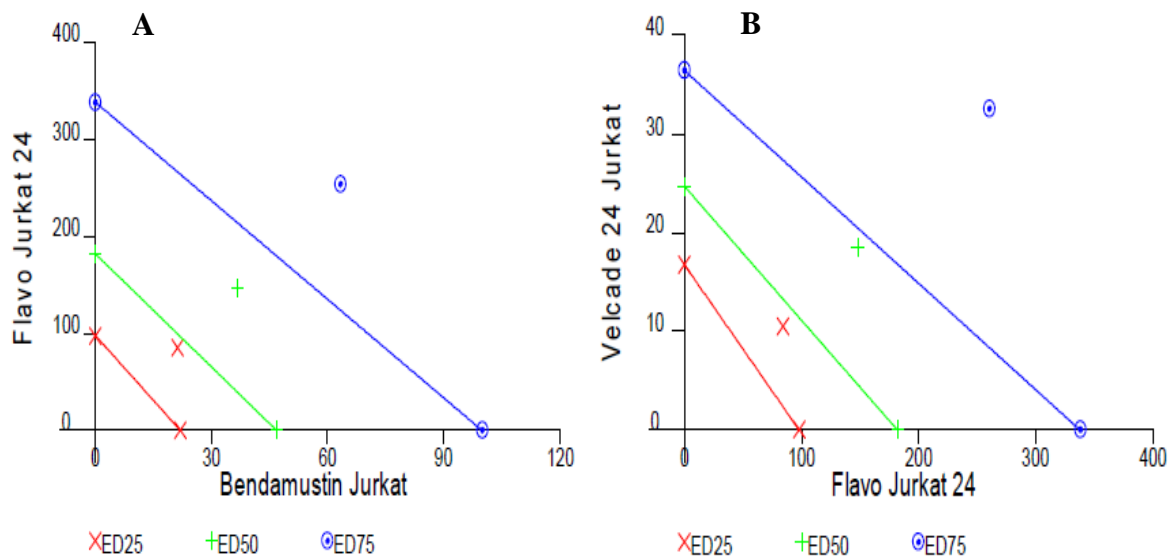
#### **5.3.2 Die Kombination aus Flavopiridol und Bendamustin zeigt bei gleichzeitiger Inkubation antagonistische Effekte in allen Zellreihen**

Die Kombination aus Flavopiridol und Bendamustin zeigte bei gleichzeitiger Applikation antagonistische  $C_i$ ( $IC_{50}$ )-Werte bei allen behandelten Zellreihen: hier konnte für Jeko-1 ( $1,53 \pm 0,491$ ), NCEB-1 ( $1,46 \pm 0,451$ ) und Jurkat ( $1,59 \pm 0,196$ ) ein ausgeprägter, für HBL-2 ( $1,14 \pm 0,144$ ) ein leichter Antagonismus nachgewiesen werden.

|                  | F+V          | B+F          |
|------------------|--------------|--------------|
| <b>Jeko-1</b>    | 1,82 (0,554) | 1,53 (0,491) |
| <b>HBL-2</b>     | 1,34 (0,216) | 1,14 (0,144) |
| <b>NCEB-1</b>    | 1,24 (0,398) | 1,46 (0,451) |
| <b>Jurkat</b>    | 1,56 (0,293) | 1,59 (0,196) |
| <b>Granta519</b> | n.r.         | n.r.         |

**Tabelle 3: Errechnete CI (IC<sub>50</sub>)-Werte nach Chou und Talaly für Kombinationen mit Flavopiridol:**

CI (IC<sub>50</sub>)-Werte der jeweiligen Kombinationen. (F=Flavopiridol, B=Bendamustin). Die Werte in Klammern geben die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte von mindestens 3 unabhängigen Experimenten an.



**Abbildung 21: WST-1 Kombinationsassays**

Dargestellt sind repräsentative, durch Calcu-Syn errechnete Isobologramme nach simultaner Behandlung von Jurkat mit Flavopiridol und Bendamustin (**A**), sowie Flavopiridol und Bortezomib (**B**) nach 24 Stunden. Die farbigen Linien repräsentieren die mittels WST-1 bestimmten IC<sub>25</sub> (rot), IC<sub>50</sub> (grün) und IC<sub>75</sub> (blau) eines Experiments.

Die farbigen Punkte stellen die nach Chou und Talalay kalkulierten CI Werte für die jeweiligen IC Werte dar. Gezeigte Kombinationen wirken antagonistisch, ersichtlich an den oberhalb der farbigen Linien liegenden zugehörigen Punkte.

## 5.4 Vi-Cell Kombinationsassays

Um die zeitgleiche Behandlung der Zellreihen Jeko-1, Granta 519, HBL-2, JVM-2, Z-138 und Jurkat mit Flavopiridol und anderer molekular agierender Substanzen zu beurteilen, wurden Auswertungen mittels Vi-Cell Messungen nach 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt und die Ergebnisse mittels der Fraction of Product Formel verrechnet. Hierzu wurden die Zellreihen zusätzlich zu Flavopiridol mit Enzastaurin, einem in klinischer Erprobung befindlicher Proteinkinase-C-Inhibitor (PKC), RAD001, ein mTor-Kinase-Inhibitor mit immunsuppressiver Wirkung und mit verschiedenen Antimetaboliten (Cytarabin, Gemcitabin und Fludarabin) inkubiert. Hierbei wurden fraction of product Werte  $<+0.1$  als mehr als additiv bzw. synergistisch, Werte  $> -0.1$  als antagonistisch gewertet. Werte zwischen beiden Punkten werden als additiv bzw. als Kombinationen ohne gegenseitigen Effekt der Medikamente bewertet.

Von den sechs untersuchten Zellreihen erwies sich zu keinem der Zeitpunkte eine Kombination von Flavopiridol und einem Antimetabolit als synergistisch. Besonders JVM-2 zeigte zu fast allen gemessenen Zeitpunkten einen Antagonismus. Ebenso zeigten Jeko-1 und Jurkat für Flavopiridol kombiniert mit Cytarabin und Gemcitabin einen Antagonismus, welcher jedoch nach 72 Stunden nicht mehr nachweisbar war.

In drei Zellreihen (Jeko-1, Granta 519 und JVM-2) wurde dagegen nach 72 Stunden bei der Kombination von Flavopiridol und Rad001 ein über-additiver Effekt beobachtet. Ebenfalls in Granta und JVM-2 wurde ein synergistischer Effekt der Kombination aus Flavopiridol und Enzastaurin nach 72 Stunden beobachtet. Diese Kombination zeigte keinerlei antagonistische Interaktionen in den untersuchten Zellreihen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Flavopiridol bei gleichzeitiger Inkubation mit einem Zytostatikum häufig einen antagonistischen Effekt zeigt, und somit die WST-Experimente mit Bendamustin bestätigt. Versuche mit Flavopiridol in Kombination mit Enzastaurin und RAD001 zeigten jedoch nach 72 Stunden Behandlung synergistische Effekte (Tabelle 3).

| 72h               | F+F           | F+C           | F+G           | F+E          | F+R           |
|-------------------|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| <b>HBL-2</b>      | 0,030         | -0,063        | -0,066        | -0,010       | <u>-0,139</u> |
| <b>Jeko-1</b>     | -0,013        | -0,071        | 0,077         | 0,048        | <b>0,123</b>  |
| <b>Granat 519</b> | <u>-0,146</u> | -0,048        | -0,053        | <b>0,168</b> | <b>0,154</b>  |
| <b>JVM-2</b>      | 0,009         | <u>-0,164</u> | <u>-0,161</u> | <b>0,109</b> | <b>0,123</b>  |
| <b>Z-138</b>      | -0,075        | -0,043        | -0,057        | -0,052       | -0,075        |
| <b>Jurkat</b>     | <u>-0,110</u> | -0,067        | -0,055        | -0,002       | -0,048        |

**Tabelle 4: Fraction of Product - Werte (Kombinationen Flavopiridol)**

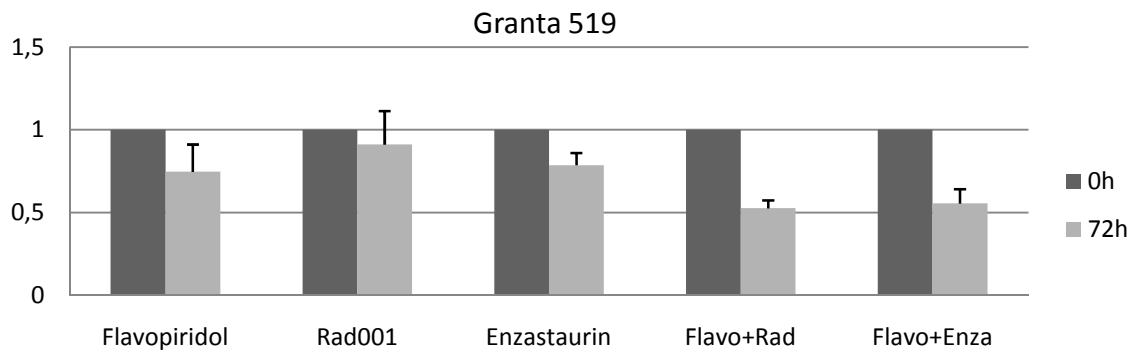
Die Zelllinien HBL-2, Jeko-1, Granta 519, Z-138, JVM-2 und Jurkat wurden über 72 Stunden mit festen Konzentrationen von Flavopiridol (100nM) und den Substanzen Rad001 (100nM), Enzastaurin (5µM), Fludarabin (0,25µg/ml), Cytarabin (0,625µg/ml) und Gemcitabin (0,025µg/ml) kombiniert. Die gemessene prozentuale Verringerung der Zellzahlen in Relation zum jeweiligen Tageswert der unbehandelten Kontrolle wurde als fraction affected anhand oben beschriebener Formel verrechnet. Fett gedruckte Zahlen markieren einen Synergismus, unterstrichene Zahlen kennzeichnen antagonistische Ergebnisse.



## Ergebnisse

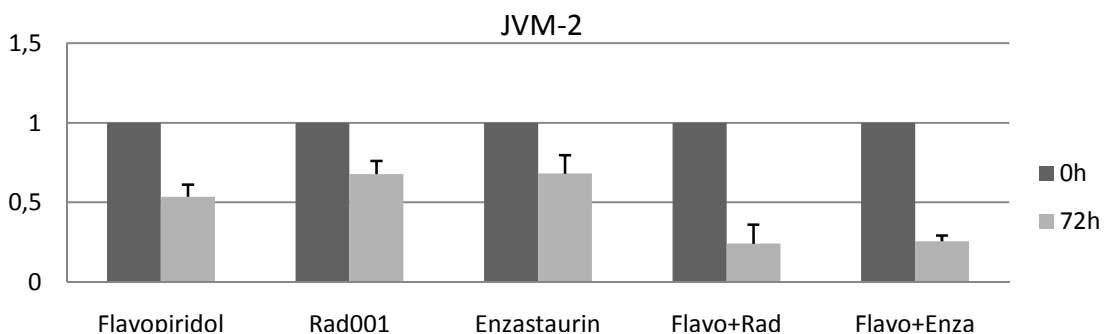
**A**

| <b>Granta 519</b> | <b>0h</b> | <b>24h</b>   | <b>STAW 24</b> | <b>48h</b>   | <b>STAW 48</b> | <b>72h</b>   | <b>STAW 72</b> |
|-------------------|-----------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|
| Flavopiridol      | 1         | <b>0,893</b> | $\pm 0,058$    | <b>0,723</b> | $\pm 0,082$    | <b>0,747</b> | $\pm 0,164$    |
| Rad001            | 1         | <b>0,998</b> | $\pm 0,080$    | <b>0,883</b> | $\pm 0,083$    | <b>0,910</b> | $\pm 0,203$    |
| Enzastaurin       | 1         | <b>0,957</b> | $\pm 0,142$    | <b>0,823</b> | $\pm 0,076$    | <b>0,786</b> | $\pm 0,074$    |
| Fludarabine       | 1         | <b>0,990</b> | $\pm 0,037$    | <b>0,916</b> | $\pm 0,072$    | <b>0,761</b> | $\pm 0,155$    |
| Cytarabine        | 1         | <b>0,554</b> | $\pm 0,060$    | <b>0,270</b> | $\pm 0,060$    | <b>0,173</b> | $\pm 0,028$    |
| Gemcitabine       | 1         | <b>0,553</b> | $\pm 0,037$    | <b>0,237</b> | $\pm 0,034$    | <b>0,148</b> | $\pm 0,014$    |
| Flavo+Rad         | 1         | <b>0,839</b> | $\pm 0,070$    | <b>0,706</b> | $\pm 0,119$    | <b>0,526</b> | $\pm 0,048$    |
| Flavo+Enza        | 1         | <b>0,813</b> | $\pm 0,026$    | <b>0,649</b> | $\pm 0,055$    | <b>0,555</b> | $\pm 0,087$    |
| Flavo+Fluda       | 1         | <b>0,853</b> | $\pm 0,071$    | <b>0,645</b> | $\pm 0,153$    | <b>0,715</b> | $\pm 0,188$    |
| Flavo+Cytara      | 1         | <b>0,564</b> | $\pm 0,047$    | <b>0,262</b> | $\pm 0,032$    | <b>0,178</b> | $\pm 0,022$    |
| Flavo+Gem         | 1         | <b>0,518</b> | $\pm 0,091$    | <b>0,263</b> | $\pm 0,014$    | <b>0,164</b> | $\pm 0,045$    |



**B**

| <b>JVM-2</b> | <b>0h</b> | <b>24h</b>   | <b>STAW 24</b> | <b>48h</b>   | <b>STAW 48</b> | <b>72h</b>   | <b>STAW 72</b> |
|--------------|-----------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|
| Flavopiridol | 1         | <b>0,694</b> | $\pm 0,125$    | <b>0,467</b> | $\pm 0,074$    | <b>0,535</b> | $\pm 0,077$    |
| Rad001       | 1         | <b>0,769</b> | $\pm 0,112$    | <b>0,617</b> | $\pm 0,052$    | <b>0,678</b> | $\pm 0,023$    |
| Enzastaurin  | 1         | <b>0,767</b> | $\pm 0,110$    | <b>0,707</b> | $\pm 0,107$    | <b>0,680</b> | $\pm 0,117$    |
| Fludarabine  | 1         | <b>0,647</b> | $\pm 0,100$    | <b>0,622</b> | $\pm 0,178$    | <b>0,676</b> | $\pm 0,152$    |
| Cytarabine   | 1         | <b>0,873</b> | $\pm 0,050$    | <b>0,473</b> | $\pm 0,037$    | <b>0,442</b> | $\pm 0,087$    |
| Gemcitabine  | 1         | <b>0,849</b> | $\pm 0,048$    | <b>0,467</b> | $\pm 0,068$    | <b>0,415</b> | $\pm 0,018$    |
| Flavo+Rad    | 1         | <b>0,484</b> | $\pm 0,071$    | <b>0,292</b> | $\pm 0,051$    | <b>0,240</b> | $\pm 0,129$    |
| Flavo+Enza   | 1         | <b>0,610</b> | $\pm 0,087$    | <b>0,334</b> | $\pm 0,098$    | <b>0,255</b> | $\pm 0,037$    |
| Flavo+Fluda  | 1         | <b>0,590</b> | $\pm 0,105$    | <b>0,392</b> | $\pm 0,094$    | <b>0,359</b> | $\pm 0,051$    |
| Flavo+Cytara | 1         | <b>0,727</b> | $\pm 0,079$    | <b>0,433</b> | $\pm 0,052$    | <b>0,400</b> | $\pm 0,041$    |
| Flavo+Gem    | 1         | <b>0,741</b> | $\pm 0,077$    | <b>0,413</b> | $\pm 0,073$    | <b>0,383</b> | $\pm 0,057$    |



### Tabellen 5 und 6: Fraction of Product - Werte

Dargestellte Tabellen und Graphen zeigen relative Zellzahlen viable Zellen bezogen auf die unbehandelten Kontrollen nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation mit Flavopiridol, RAD001, Enzastaurin und den Kombinationen der Medikamente. Gezeigt sind Daten mit Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten der Zelllinien Granta 519 (A) und JVM-2 (B), in denen ein Synergismus nach 72h Inkubation von Flavopiridol und Enzastaurin sowie Flavopiridol und RAD001 nachgewiesen werden konnte. Die Graphen zeigen die Ergebnisse nach 72h Inkubation.

## 6 Diskussion

Das Mantelzelllymphom ist durch eine aggressive Klinik sowie eine ausgeprägte Resistenz gegenüber konventionellen Chemotherapeutika charakterisiert. Demzufolge hat dieses Lymphom die schlechteste Langzeitprognose aller B-NHL mit einer medianen Überlebenszeit von nur 3 Jahren (*Bosch, 1998, Bertoni, 2004*). Trotz einer signifikanten Verbesserung des Gesamtansprechens und einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens durch Hinzunahme des Antikörpers Rituximab zu den etablierten Regimes (R-CHOP, R-FCM, R-MCP), konnte bisher keine Heilung dieses Lymphomtyps erzielt werden. Einzig die allogene Knochenmarktransplantation scheint bisher ein potentiell kurativer Therapieansatz zu sein (*Dreyling, 2007*). Aufgrund dieser unbefriedigenden therapeutischen Situation sind neue Substanzen, die in Kombination mit bisher bewährten Therapieschemata das therapeutische Spektrum erweitern und zu einer Verbesserung von Prognose und Lebensqualität der Patienten führen, dringend erforderlich. Zwei Medikamente, die eine Effektivität gegen maligne Neoplasien *in vitro* als auch *in vivo* zeigen konnten, sind Flavopiridol und Bendamustin, und stellen somit interessante Ansätze für eine weitere Verbesserung der Therapie des Mantelzelllyphoms dar.

Zunächst konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass Bendamustin eine dosis- und zeitabhängige zytotoxische Wirkung auf die untersuchten Zelllinien *in vitro* hat: nach 24 Stunden Inkubation mit 25µg/ml Bendamustin lag die Zahl der viablen Zellen zwischen 10% und 92,9% der unbehandelten Kontrolle. Hierbei war Karpas 422 als follikuläres Lymphom die resistenteste untersuchte Zelllinie. Eine Mantelzelllymphom-spezifische Wirkung liegt aufgrund des guten Ansprechens von der T-Zelllinie Jurkat nicht vor. Den stärksten zytotoxischen Effekt hatte Bendamustin auf die MCL-Zelllinien Z-138, Jeko-1 und HBL-2. Die unempfindlichsten untersuchten MCL-Zelllinien waren Granta 519 und NCEB-1. Der antiproliferative Effekt von Bendamustin unterscheidet sich, im Vergleich der sensitivsten (Z-138) und resistentesten Zelllinie (Karpas 422), mit Unterschieden zwischen den absoluten Zellzahlen bis zu 39% nach 24 und 55% nach 48 Stunden.

Diese Ergebnisse konnten durch Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte nach 24-stündiger Inkubation bestätigt werden. Auch hier zeigte sich NCEB-1 und Granta 519 als deutlich resistenter als die anderen mittels WST-1 untersuchten MCL-Zelllinien. Der

IC<sub>50</sub>-Wert der Kontrollzelllinie Jurkat lag im Bereich der MCLs. Bei allen Zelllinien, außer bei Karpas 422, erwies sich eine 48 stündige Inkubation mit 50µg/ml Bendamustin effektiver in der zytoreduktiven Wirkung als eine höhere Dosierung nach 24 Stunden. Dies weist auf eine prolongierte antineoplastische Aktivität von Bendamustin *in vitro* hin.

Es ist bekannt, dass p53 durch Aktivierung von Onkogenen, durch zellulären Stress, Hypoxie, DNA-Schäden oder andere biologische Noxen in der Zelle akkumuliert und als wichtiger Transkriptionsfaktor Apoptose, Zyklusarrest oder Differenzierung reguliert (Stieve, 2007). Korreliert man die Sensibilität auf Bendamustin mit der Mutation von Tumor-Suppressorgenen am Beispiel von p53 in Z-138 (Wildtyp), Jeko-1 (Wildtyp), Granta 519 (Wildtyp) NCEB-1 (mutiert) und HBL-2 (mutiert), zeigt sich der p53 Wildtyp und mutiertes p53 jeweils in den resistenten als auch in den sensiblen Zelllinien, und lässt somit keinen direkten Rückschluss auf p53-Status und Sensibilität auf Bendamustin zu.

Einerseits bestätigen diese Ergebnisse Beobachtungen in Mantelzelllymphom- und CLL-Zelllinien von Roue et al., dass Bendamustin eine Aktivierung der intrinsischen Apoptose-Kaskade durch Bildung von reaktiven Sauerstoff, eine starke p53-unabhängige Hochregulation der pro-apoptotischen bcl-2 Proteinen PUMA, NOXA, BAK und BAX, sowie Freisetzung von zytosolischen mitochondrialen pro-apoptotischen Proteinen in Zellen mit p53 Mutationen bewirken kann.

Andererseits konnte eine durch Bendamustin bewirkte Stabilisierung von p53 und somit eine direkte Hochregulation von pro-apoptotischen bcl-2 Proteinen, insbesondere von PUMA und NOXA, in Zellen mit p53 Wildtyp gezeigt werden. (Shibue, 2006, Roue, 2008). Auch Leoni et al. konnten einen positiven Effekt von Bendamustin auf die Expression von p53 und von p53 regulierten Genen nachweisen (Leoni, 2008).

Zudem verursacht Bendamustin stabilere und häufigere DNA-Strangabbrüche als Cyclophosphamid, Carmustin oder Melphalan und aktiviert im Gegensatz zu den anderen Alkylantien einen Basen-Exzisions DNA-Reparatur-Mechanismus, und nicht einen Alkyltransferase DNA-Reparatur-Mechanismus (Strumberg, 1996).

Diese Beobachtung legt nahe, dass Bendamustin weniger empfänglich für Alkylguanyl-Transferase assoziierte Resistenzen ist (Leoni, 2004). Verglichen zu Cyclophosphamid bewirkt Bendamustin auch eine vielfach höhere Expression von Exonuclease-1 in den Zellen, ein für die DNA-Reparatur wichtiges Gen (Leoni, 2008).

Sowohl die durch Bendamustin via p53 vermittelten pro-apoptotischen zellulären Stimuli in Zusammenhang mit der Aktivierung alternativer Reparaturmechanismen, als auch die verstärkt auftretende „mitotic catastrophe“ erklären die beobachtete klinische Aktivität von Bendamustin in Chemotherapie-resistenten Tumoren (*Friedberg, 2008, Castedo, 2004*).

Entsprechend zeigten Lissitchkov et al. in einer Phase-I Studie mit 16 CLL Patienten, von denen 13 Chlorambucil resistent waren, eine ORR von 56% nach Behandlung mit Bendamustin bei einem PFS von durchschnittlich 42.7 Monaten (*Lissitchkov, 2006*). Ebenso demonstrieren Ergebnisse von Friedberg et al. eine hohe Effektivität von Bendamustin in rezidierten oder refraktären indolenten NHL nach Rituximab-haltigen Regimes: in dieser Phase-II Studie mit 76 Patienten zeigte sich eine ORR von 77%, wovon 34% der Patienten eine CR zeigten. In der Subpopulation, die zuvor mit Alkylantien behandelt worden war, lag die ORR bei 61% mit 13% CR. Diese Daten sprechen somit eindrücklich für die Rolle von Bendamustin in vorbehandelten, refraktären indolenten Lymphomen (*Friedberg, 2008*).

In Europa wird Bendamustin bei der CLL momentan vorwiegend in der Behandlung der Fludarabin-refraktären CLL, oder als initiales Therapeutikum für alte und komorbiden Patienten eingesetzt, die nicht für ein Fludarabin-haltiges Regime als first-line in Frage kommen.

Die klinische Effektivität von Bendamustin im MCL ist ebenfalls vielversprechend, insbesondere durch die Hinzunahme von Rituximab. Hier stellen der bereits *in vitro* beobachtete Synergismus, eine fehlende Ausbildung von Kreuzresistenzen und sich nicht überlappende Nebenwirkungen bei der Kombination Bendamustin plus Rituximab (BR) die entscheidenden Gründe für die Etablierung dieses neuen Regimes (*Chow, 2002*). Diese Kombination erreichte in indolenten NHL eine ORR von 90%, wovon 60% eine CR erreichten. Patienten mit MCL erreichten in dieser Phase-II Studie eine ORR von 75% und 50% eine CR. Das mediane PFS bei MCL Patienten waren 18 Monate, bei dem restlichen Kollektiv 24 Monate (*Robinson, 2008*).

Die Studiengruppe indolente Lymphome (StIL) verglich die Kombination aus Bendamustin und Rituximab (B-R) in einer Phase-III-Studie mit dem bisher etablierten Regime CHOP plus Rituximab (R-CHOP) bei insgesamt 513 zuvor unbehandelten Patienten mit Follikulären-, Marginalzonen-, Mantelzelllymphomen und Morbus Waldenström.

Die Rate von CR und die Dauer des PFS von B-R lag bei diesen Entitäten signifikant höher als von R-CHOP (39,6 % vs. 30,0 % CR; 54,9 vs. 34,8 Monate PFS) bei einer insgesamt deutlich verbesserten Verträglichkeit. Falls sich diese Ergebnisse in weiteren Studien reproduzieren lassen, spräche dies für B-R als zukünftiges Erstlinienregime bei diesen Entitäten.

Vor einer malignen Entartung einer Zelle kommt es zu einer Anhäufung verschiedener genetischer Mutationen. Diese führen zu einem Verlust der natürlichen Kontrollmechanismen der Zellproliferation; die Tumorzellen sind somit in der Lage, trotz Anhäufung von DNA-Schäden unkontrolliert zu proliferieren (*Hanahan und Weinberg, 2000, Sawyers, 2004*). Die Identifikation der jeweiligen Kontrollmechanismen, der dysregulierten biologischen Kaskaden und der spezifischen genetischen Mutationen, die in Tumoren aktiv sind, eröffnen gleichsam neue Optionen für eine selektive Tumorthherapie, sog. Molekular gezielte Therapien.

Die hier verwendeten Substanzgruppen greifen gezielt in den zellulären Stoffwechsel ein und beeinflussen tumorbiologisch relevante Signalwege, die ein Fortschreiten der Tumorerkrankung bedingen. Hierzu zählen Zellprogramme wie Angiogenese, Zellproliferation, Metabolismus, Motilität oder Apoptose. Die pharmakologische Intervention kann hierbei auf der Zelloberfläche erfolgen und z.B. eine rezeptorvermittelte Unterbindung von Wachstumsreizen, bzw. eine Aktivierung von pro-apoptischen Signalkaskaden bedingen, oder direkt intrazellulär spezifische Proteinfunktionen modellieren.

Ein solch intrazellulär ansetzender Wirkstoff ist das Flavopiridol, ein pan-Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) Inhibitor. Für flavonoide Verbindungen wie Flavopiridol konnte bereits 1990 eine zytostatische Interaktion mit normalen und malignen hämatologischen Zellen nachgewiesen werden (*Larocca, 1990, 1991*). Aufgrund der pathognomonischen Translokation t (11; 14) und daraus resultierenden Dysregulation der Cyclin D1-Expression im Mantelzelllymphom und der direkten durch Flavopiridol nachgewiesenen Inhibition der Cyclin-abhängigen Kinasen, scheint Flavopiridol für das Mantelzelllymphoms ein besonders attraktiver therapeutischen Ansatz zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die antiproliferative Wirkung von Flavopiridol in Titrationsstufen von 800 bis 50 nM an den Zelllinien untersucht:

Nach 24 Stunden Inkubation mit Falvopiridol in der maximalen verwendeten Dosierung von 800nM lag die Zahl der viablen Zellen zwischen 12% bis 90% der unbehandelten Kontrolle. In klinisch erreichbarer Dosierung konnte somit in allen

Zelllinien die Proliferation effektiv gehemmt und Apoptose induziert werden. Hierbei war Granta 519 die resistanteste und Jeko-1 die empfindlichste untersuchte Zelllinie. Vergleicht man die Wirkung von Flavopiridol anhand dieser beiden Zelllinien bei der niedrigsten Konzentration von 50nM, zeigt sich praktisch kein Effekt nach 48h bei Granta 519, wogegen Jeko-1 mit einer Zellverringerung relativ zum Ausgangswert einen klaren Effekt dieser niedrigen Flavopiridol Dosierung belegt. Eine spezifische Wirkung auf Mantelzelllymphom-Zelllinien ist durch das gute Ansprechen von Jurkat und Karpas nicht belegt worden.

In den untersuchten Zelllinien konnte keine Korrelation zwischen Sensibilität auf Flavopiridol und Mutationen von p53 gefunden werden. Diese Ergebnisse decken sich somit mit Beobachtungen von Shapiro, Zoya und Byrd, welche ebenfalls eine p53 unabhängige Apoptoseinduktion von Flavopiridol in verschiedenen Tumor-entitäten nachweisen konnten (*Shapiro, 1999, Zoya, 2004, Byrd, 1998*). Insgesamt zeigte sich ein stark variierendes Dosis-Zeit-Wirkungsprofil von Flavopiridol in den untersuchten Zelllinien. Bei NCEB-1, Z-138 und Jurkat wurde keine erhöhte Effektivität von Flavopiridol nach 48h bei den höheren Dosierungen beobachtet, wohingegen bei den restlichen Zelllinien Jeko-1, Karpas 422, HBL-2, Granta 519 und JVM-2 eine weitergehende Verringerung der Zellzahlen nach 48 Stunden zu beobachten war. Bei den resistantesten Zellreihen JVM-2 und Granta 519 war nur nach 48h eine Erniedrigung der absoluten Zellzahlen zu erreichen. Diese Ergebnisse konnten durch Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte nach 24-stündiger Inkubation bestätigt werden. NCEB-1 zeigte im Vergleich zu der sensitivsten Zelllinie Jeko-1 einen 5.7 und zu Jurkat einen 1.6 fach höheren IC<sub>50</sub> Wert.

Diese Beobachtungen decken sich mit Untersuchungen von Parker et al., die die Sensitivität verschiedener hämatologischer Zellreihen untersuchten und Werte zwischen 80 und 450 nmol/L als IC<sub>50</sub>-Wert für Flavopiridol nach 24 Stunden Behandlung definierten (*Parker, 1998*). Ebenfalls konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der apoptotischen Wirkung von Flavopiridol in den meisten Zellreihen ein Zellzyklusarrest voraus geht. Obwohl in initialen Pilotexperimenten dieser Arbeit Apoptosen auch zu einem früheren Zeitpunkt beobachtet werden konnten, führten nur höhere Dosierungen zu einem Zelltod, veranschaulicht anhand des Kurvenverlaufs der nach 24 und 48 Stunden ausgezählten Experimente. Bei den niedrigen Dosierungen (100-200nM) erfolgte nach 48 Stunden erneut eine Proliferation der Zellen bei den meisten Zelllinien, im Gegensatz dazu waren bei allen Zelllinien in den

hohen Dosierungen (400-800nM) weniger Zellen nach 48 nachweisbar. Shapiro et al. konnten ebenfalls an NSCLC-Zellreihen mit niedrigen Dosierungen von 100-200nM zeigen, dass der durch Flavopiridol vermittelten Apoptose meist ein Zyklusarrest in der G1 und G2-Phase vorausgeht, übereinstimmend mit der Inhibition von CDK1, 2, 4 und 6 (*Shapiro, 1999*).

Ähnliche Ergebnisse mit NSCLC-Zellen wurden von Bible und Kaufmann publiziert. Hier wurde zudem demonstriert, dass Flavopiridol auch in teilungsunfähigen Zellen Apoptose auslösen kann, jedoch werden hierzu höhere Dosierungen benötigt (*Bible, 1996*). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Flavopiridol in höheren Konzentrationen auch andere molekulare Zielstrukturen neben den CDKs affektieren könnte. In diesem Kontext scheinen vor allem PKC (Proteinkinase C) und EGF-Rezeptoren (Epithelium-Derived-Growth-Factor), welche ebenfalls einer direkten Inhibition durch Flavopiridol unterliegen, eine entscheidende Rolle zu spielen (*Czech, 1995, Sedlaceck, 1996, 2001*).

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die Wirkung von Flavopiridol auf den Zellzyklus in verschiedenen Dosierungen (50, 100, 200nM) und zu verschiedenen Zeitpunkten (4, 24, 48h) untersucht:

In allen Zellreihen erwies Flavopiridol eine dosis- und zeitabhängige Verringerung der S-Phase von bis zu 40% bei einem gleichzeitigen Anstieg der G1- und G2/M- Phase Zellpopulationen um bis zu 22% und zeigt somit einen potenten G1/S- und G2/M-Arrest auf. Hierbei korreliert der Grad des Zyklusarrestes mit der Sensitivität der Zelllinien. Jeko-1 reagierte als Zellreihe mit dem niedrigsten IC<sub>50</sub> mit den stärksten Verschiebungen im Sinne eines Zyklusarrest, wohingegen Granta 519 und NCEB-1 als resistanteste untersuchte Zellreihen zwar einen G1/S-Block aufzeigten, jedoch praktisch keinerlei G2/M-Arrest demonstrierten. Neben Cyclin A-cdk2 und Cyclin B-cdk1 sind eine Gruppe von CDK-Inhibitoren, die Cip/Kip und INK4 Proteinfamilien, entscheidend an der G2/M-Transition beteiligt (*Pines, 1991, Sherr, 1995, 1999*).

Eine Überexpression von Cyclinen und/oder mangelhafte Expression von CDK-Inhibitoren als Resultat von genetischen oder epigenetischen zellulären Ereignissen ermöglicht malignen Tumoren selektive Wachstumsvorteile; somit könnten quantitative oder qualitative Veränderungen dieser Regulatoren eine Erklärung für die vergleichbar hohe Resistenz und geringe G2/M-Blockade durch Flavopiridol in den Zelllinien Granta 519 und JVM-2 sein (*Sherr, 1996, Hall, 1996*).

Betrachtet man die in der Literatur publizierten IC<sub>50</sub>-Werte für Flavopiridol in ver-

schiedenen Tumoren, zeigen sich große Unterschiede. Die Möglichkeiten eines Medikaments, spezifisch Zellen einer gewissen Abstammung zu schädigen, hängt von vielen Faktoren ab; so spielen selektive Aufnahme- und Bindungsprozesse des Wirkstoffs, die individuelle Konzentration der molekularen Zielstruktur in den jeweiligen Geweben, oder das Vorhandensein spezifischer intrinsischer metabolischer bzw. detoxifizierender Systeme eine große Rolle. Die antineoplastische Wirkung von Flavopiridol ist in hämatolymphatischen Zelllinien am stärksten ausgeprägt, gefolgt von Tumoren aus dem HNO Bereich, Brustkrebs und nichtkleinzelligem Lungenkrebs (*Sedlacek, 2001*). Urothel-, Prostata-, Ösophagus und Magenkarzinom-Zelllinien mit  $IC_{50}$ -Werten von bis zu 1000nM sprechen, verglichen mit den hämatologischen Tumorentitäten, schlechter auf eine Behandlung mit Flavopiridol an (*Parker, 1998, Schwartz, 1996, Schrupp, 1998, Chien, 1999, Patel, 1998*).

Eine tumorspezifische antiproliferative Wirkung von Flavopiridol konnte bisher nicht demonstriert werden. So zeigen gesunde humane periphere Lymphozyten in Versuchen eine fast ebenso hohe Apoptoserate wie maligne Lymphozyten, ebenso konnte in Lungenkarzinomzellen, Lungenfibroblasten und normalen Bronchialepithelzellen ein ähnliches Ansprechen auf Flavopiridol *in vitro* demonstriert werden (*Brusselbach, 1998, Giovanni, 1999*). Jedoch scheint Flavopiridol auf Zellen in der Teilung, insbesondere auf Tumorzellen mit dysregulierten Zellzyklus, zu einem viel früheren Zeitpunkt und zu einem höheren Maße apoptotisch zu wirken. Matranga et al. untersuchten in diesem Kontext die phasen- und zyklusspezifische Wirkung von Flavopiridol auf NSCLC-Zelllinien. In diesen Experimenten wurde in verschiedene Zellpopulation mittels Präinkubation mit niedrigen Dosen von Hydroxy-Urea, Gemcitabin oder Cisplatin eine Rekrutierung in die S-Phase vermittelt und sequenziell mit Flavopiridol inkubiert.

Ein direkter Vergleich von normalen Zellen zu Zellpopulationen mit S-Phasen Rekrutierung zeigte eine signifikant verminderte Viabilität für letztere Gruppe (*Matranga, 2002*). Der genaue Grund für die S-Phasen Sensitivität ist hierbei noch nicht ausreichend geklärt, ein möglicher Mechanismus könnte aber die Cyclin A-CDK2-Inhibition während der S-Phase sein: Rb verhindert ein Voranschreiten des Zellzyklus, indem es Proteine der E2F Transkriptionsfaktor-Familie bindet; Rb-E2F Komplexe sind potente Transkriptions-Inhibitoren (*Harbour, 2000*). Nach dem G1-S Übergang reguliert E2F die Transkription von einer Vielzahl für die S-Phase



notwendigen Genen. Dieser Transkriptionsfaktor ist nur vorübergehend aktiv; die zeitlich genau abgepasste Deaktivierung durch Cyclin A-CDK2 ist kritisch für eine korrekte S-Phasen-Progression (*Krek, 1994*). Wenn Cyclin A-CDK2 durch Flavopiridol inhibiert wird, bleibt die zeitlich korrekte Neutralisation von E2F aus. Außergewöhnlich hohe und verlängerte E2F-Aktivität während der S-Phase löst in den Zellen p53-abhängige als auch p53-unabhängige pro-apoptische Stimuli aus und trägt somit wahrscheinlich zu der hohen Sensitivität der Zellen auf Flavopiridol in der S-Phase bei (*Chen, 1999, Philips, 2001*). Die durch Flavopiridol via CDK-Inhibition vermittelte Rb-Dephosphorylisation während der S-Phase bewirkt zusätzlich eine Inhibition der DNA-Synthese und bietet einen weiteren Erklärungsansatz für den beobachteten Effekt, da Rb normalerweise phosphoryliert und somit inaktiv während der S, G2 und M-Phase vorliegt (*Knudsen, 1998*).

Die Tatsache, dass Flavopiridol vor allem in der S-Phase eine Apoptose bewirkt, versucht man sich für neue Therapieansätze in Kombination mit anderen Zytostatika zunutze zu machen. Eine Arbeit von Bible et al. untersuchte die Kombination von Flavopiridol mit Mitosehemmern (Paclitaxel, Topotekan, Etoposid), Antimetaboliten (5-FU, Cytarabine), Alkylantien (Cisplatin, Carmustin) und einem Anthrazyklin (Doxorubicin) an Lungen- und Ovarialkarzinom-Zelllinien. Dabei erwies sich die Sequenz der Applikation als entscheidend für einen potentiellen Synergismus oder Antagonismus.

Am Beispiel von Paclitaxel, einem M-Phasen spezifischen Zytostatikum, wurde dieser Effekt am deutlichsten: Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit Flavopiridol und Paclitaxel oder in der Sequenz Flavopiridol-Paclitaxel wurden in allen Zellreihen starke antagonistische Effekte beobachtet. Wenn Paclitaxel einige Stunden vor Flavopiridol verabreicht wurde, war ein starker Synergismus in allen untersuchten Zellreihen zu beobachten. Dieser Effekt war nicht auf die Kombination mit Paclitaxel limitiert, sondern war auch für alle untersuchten Antimetaboliten (außer 5-FU) und Alkylantien reproduzierbar. Diese Sequenz-abhängige Verringerung der Toxizität scheint darauf zurückzuführen zu sein, dass Flavopiridol einen Arrest des Zellzyklus in den überlebenden Zellen verursacht und somit den zytotoxischen Effekt von Zellzyklus-spezifischen Medikamenten verringert (*Bible, 1997*).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antimetaboliten Fludarabin, Cytarabin, Gemcitabin und Bendamustin als Hybridalkylanz, wurden alle simultan mit Flavopiridol verabreicht und zeigen eine deutliche Unterlegenheit dieser

Kombinationen bei gleichzeitiger Inkubation. Diese *in vitro* Daten bestätigen somit die Beobachtungen von Bible et al. und unterstreichen die enorme Bedeutung der Sequenz bei der kombinierten Applikation von antineoplastischen Medikamenten im Mantelzelllymphom.

Andererseits konnte in dieser Arbeit bei einer zeitgleichen Inkubation von Flavopiridol mit Rad001 bei drei Zellreihen und bei einer zeitgleichen Inkubation mit Enzastaurin bei zwei Zellreihen ein mehr als additiver Effekt beobachtet werden.

Da für diese Experimente die Medikamente in subletalen Dosierungen kombiniert wurden und kaum Apoptosen nachweisbar waren, weisen diese Ergebnisse auf eine verlängerte bzw. potentere Zellzyklus-Inhibition hin.

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase / Akt / mammalian-Target-of-Rapamycin (mTOR) Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellüberleben und Proliferation. Als Serin/Threonin-Kinase reguliert die mTOR-Kinase Funktionen wie Überleben, Wachstum, Proliferation und Motilität von Zellen (*Georgakis, 2006*). Als downstream-Ziele von mTOR konnten u.a. S6K-1 and 4E-BP1 nachgewiesen werden, welche die Expression von Kontrollproteinen des G1-S Überganges regulieren. Zu diesen Proteinen gehört u.a. p21 und Cyclin D1 (*Fingar, 2002, Hashemolhosseini, 1998*). RAD001 führt zu einer nachgewiesenen Verringerung von G1 Cyclin/CDK Komplexen und somit in der späten G1/S Phase zu einem Arrest (*Majewski, 2000*).

Dieser Mechanismus könnte somit für den prolongierten Zyklusarrest in Jeko-1, Granta 519 und JVM-2 verantwortlich sein und die beobachtete synergistische Aktivität beider Substanzen erklären.

Eine weitere wichtige Kinase für intrazelluläre Signaltransduktion ist die Proteinkinase C (PKC). PKC-Aktivität trägt zu Tumorüberleben, Differenzierung und Proliferation bei, und wird in Zusammenhang mit dem Voranschreiten von Tumorerkrankungen, insbesondere von B-Zell-Lymphomen, malignen Gliomen und kolorektalen Karzinomen gebracht. (*Shipp, 2002, da Rocha, 2002, Gokmen-Polar, 2001*) Enzastaurin, ein selektiver PKC- $\beta$ -Inhibitor, zeigt neben stark ausgeprägten antiangiogenetischen auch antiproliferative und Apoptose-induzierende Effekte, indem es durch Unterdrückung der Phosphorylierung von GSK3h, ribosomalen Protein S6 und AKT in die Zellbiologie und Tumorprogression eingreift, und weist somit auch gewisse Ähnlichkeiten in der antineoplastischen Aktivität zu RAD001 auf (*Jeremy, 2005*).

Als Theorie für den beobachteten synergistischen Effekt von Flavopiridol und Enzastaurin in Granta 519 und JVM-2 könnte eine zusätzliche Inhibition von PKC-Aktivität durch Flavopiridol sein (Sedlacek, 1996).

Interessanterweise zeigten die beiden auf Flavopiridol resistenten Zelllinien Granta 519 und JVM-2 nach simultaner Inkubation mit RAD001 als auch mit Enzastaurin synergistische Ergebnisse nach 72 Stunden, und sprechen für eine Überwindung von Resistenzmechanismen dieser Zelllinien bei simultaner Inkubation.

Trotz der viel versprechenden präklinischen Aktivität von Flavopiridol *in vitro* als auch im Tiermodell, enttäuschte Flavopiridol in klinischen Studien. In verschiedensten soliden Tumoren konnte nur bei einer geringen Anzahl von Patienten eine SD unter Flavopiridol-Behandlung erreicht werden, darüber hinaus war praktisch keine anti-neoplastische Aktivität zu beobachten (Sausville, 2005, Senderowicz, 2005, Kouroukis, 2003, Aklilu, 2003, Burdette-Radoux, 2004, Liu, 2004, Schwartz, 2001, Schapiro, 2001).

Ebenso enttäuschend waren die klinischen Ergebnisse bei der CLL (Byrd, 2005, Flinn, 2005) und anderen hämatologischen Malignomen (Lin, 2002). Beim MCL zeigte eine Studie mit 28 Patienten eine ORR von 18% und keine CR, was zu einem frühen Studienabbruch führte (Kouroukis, 2003). Wie bereits eingangs erwähnt, erklären die Untersuchungen von Phelps et al. die beobachtete Diskrepanz zwischen der Effektivität von Flavopiridol *in vitro* und *in vivo*:

Alle früheren Studien waren auf *in vitro* Daten unter Verwendung von fetalen Kälber Serum (FKS) aufgebaut, und aufgrund einer nicht bekannten, abweichenden Plasmaeiweißbindung in humanen Serum konnte kaum klinische Wirksamkeit beobachtet werden. Eine Anpassung an die humane Pharmakokinetik in modifizierten Applikations-Protokollen zeigte erstmals deutliche antineoplastischen Effekte.

Als Bolus-Infusion zeigte Flavopiridol bei Patienten mit refraktärer CLL eine viel versprechende Aktivität in einer Phase-I Studie; das progressionsfreie Überleben betrug 11,7 Monate, unabhängig von der zytogenetischen Risikogruppe.

Vielmehr zeigt Flavopiridol ebenfalls ein Ansprechen bei Patienten mit genetischem Hochrisikoprofil, del(17p13) und del(11q22), und weist ähnliche Aktivität auf wie die in dieser Gruppe wirksame Substanz Alemtuzumab bei besserer Verträglichkeit und weniger Nebenwirkungen.

Eine Korrelation zwischen AUC von Flavopiridol und dessen Metaboliten, dem klinischem Ansprechen und der Wahrscheinlichkeit von schweren Nebenwirkungen (Tumorlyse-Syndrom, Zytokin-release-Syndrom), konnte ebenfalls in dieser Arbeit demonstriert werden (Phelps, 2009)

Verschiedene Studien untersuchen momentan die humane Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Flavopiridol genauer, und den Zusammenhang zwischen Effektivität, Toxizität und applizierter Dosis zu charakterisieren. Zusätzlich wird versucht, das Plasmaprotein das Flavopiridol bindet zu identifizieren, und somit das Ansprechen vorhersagen zu können (Byrd, 2008).

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, bei der gleichzeitigen Gabe von Flavopiridol und antimetabolisch wirkenden Zytostatika, einen häufigen Antagonismus und sprechen eher für eine zukünftige Kombination mit anderen molekular-gezielten Therapeutika beim Mantelzelllymphom.

Weitergehende Untersuchungen zur Erfassung von noch unbekanntem Sequenz-abhängigen Interaktionen im Sinne eines Antagonismus oder eines Synergismus bei der Applikation der Medikamente stehen allerdings noch aus.

## 7 Zusammenfassung

Das Mantelzelllymphom ist durch eine reziproke Translokation t(11; 14) (q13; q32) und die daraus resultierende Überexpression von Cyclin D1 charakterisiert. Dieses Lymphom zeichnet sich durch eine aggressive Klinik und eine insgesamt schlechte Langzeitprognose aus.

Im Vordergrund der Arbeit stand einerseits die Charakterisierung der Wirkung von Bendamustin und Flavopiridol in Abhängigkeit von der applizierten Substanzmenge. Zum anderen war es Ziel, anhand verschiedener Viabilitätsassays Kombinationen dieser Substanzen mit in der Klinik etablierten Chemotherapeutika auf antagonistische oder synergistische Interaktionen hin zu untersuchen.

Des Weiteren wurde unter Verwendung von Zellzyklusanalysen und Proteinuntersuchungen die genauere antineoplastische Wirkung von Flavopiridol auf die verwendeten Zelllinien untersucht.

Die *in vitro* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit weisen eine dosis- und zeitabhängige zytotoxische Aktivität von Bendamustin nach, und spiegeln somit die hohe klinische Effektivität bei der Behandlung des MCL wieder.

Ebenso konnte anhand der hier gezeigten Versuchsreihen demonstriert werden, dass der Cyclin-abhängige-Kinasen-Inhibitor Flavopiridol als Monosubstanz hochwirksam gegen MCL-Zelllinien *in vitro* ist.

Nach Behandlung mit Flavopiridol konnte in allen untersuchten Zelllinien in klinisch realisierbaren Dosierungen Apoptose induziert werden, Verringerungen der CDK-Expression nachgewiesen, und darüber hinaus eine potente Inhibition des Zellzyklus im Sinne eines G1/S und G2/M Arrest demonstriert werden.

Die selektive Hemmung der CDKs stellt somit einen attraktiven, zielgerichteten Ansatz in der Tumorthherapie dar, denn diese Enzyme sind in den meisten malignen Zellen zur Aufrechterhaltung einer unbegrenzten Proliferation notwendig.

Für die Kombination von Flavopiridol mit Enzastaurin und Rad001 konnte, ins besonders in resistenten Zellreihen, ein mehr als additiver Effekt gezeigt werden;

diese Erkenntnis spricht für eine Komplementarität in der antineoplastischen Wirkung dieser Substanzen bei zeitgleicher Inhibition der jeweiligen zellulären Zielstrukturen.

Andererseits konnte für Kombinationen von Flavopiridol mit antimetabolisch-wirkenden Chemotherapeutika und Bendamustin, bei gleichzeitiger Anwendung, nur antagonistische Effekte beobachtet werden.

Hier scheint der durch Flavopiridol verursachte potente Zyklusarrest am G1/S-Übergang der Grund für die verminderte Wirksamkeit der verwendeten phasenspezifischen Medikamente zu sein. Diese Resultate unterstreichen die enorme Bedeutung der Sequenz bei der Verabreichung von zytostatisch wirkenden Stoffen in der Therapie von Malignomen.

Die Erkenntnisse über Medikamentenwirkungen aus *in vitro* Experimenten lassen sich allerdings nicht ohne weiteres auf komplexe Systeme *in vivo* übertragen und müssen deshalb berücksichtigt werden. Folgende Gründe sind hierfür ursächlich: Zum einen sind viele wichtige antineoplastische Mechanismen in der Zellkultur nicht messbar bzw. quantifizierbar, etwa eine Hemmung der Angiogenese, Veränderungen des Mikromilieus der Tumorzellen oder zelluläre Immunantworten. Zum anderen sind die Biodistribution, die Pharmakodynamik und die Pharmakokinetik *in vivo* entscheidend, ob überhaupt eine Wirkung des Medikaments an der Tumorzelle entfaltet werden kann.

Die Auswirkungen dieser Faktoren in komplexen biologischen Systemen sind jedoch *in vitro* nicht einwandfrei zu beurteilen und können, am Beispiel von Flavopiridol, zu falschen Rückschlüssen bei der klinischen Anwendung eines Medikaments führen.

## 8 Literaturverzeichnis

Abe M, Nozawa Y, Wakasa H, Ohno H, Fukuhara S, "Characterization and comparison of two newly established Epstein-Barr virus-negative lymphoma B-cell lines. Surface markers, growth characteristics, cyto- genetics, and transplantability" *Cancer* 61: 483–90, (1988)

Andersen L.H, Jensen MK, de nully Brown P, Geisler CH, „A danish population based analyses of 105 mantle cell lymphoma patients; incidences, clinical features, response, survival and prognostic factors" *Eur J Cancer* 38: 401-408, (2002)

Amundson S.A, Myers TG, Fornace AJ, "Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress" *Oncogene* 17: 3287–99, (1998)

Aklilu M, Kindler HL, Donehower RC, Mani S, Vokes EE, "Phase II study of flavopiridol in patients with advanced colorectal cancer" *Ann Oncol.* 14: 1270-1273, (2003)

Argatoff L, Connors J, Klasa R, Horsman D, Gascoyne R, "Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases" *Blood* 89: 2067-2078, (1997)

Arguello F, Alexander M, Sterry JA., Tudor G, Smith EM, Kalavar NT, Greene JF, Koss W, Morgan CD, Stinson SF, Siford TJ, Alvord WG, Klabansky RL, Sausville E, "Flavopiridol induces apoptosis of normal lymphoid cells, causes immunosuppression and has potent antitumor activity in vivo against human leukemia and lymphoma xenografts" *Blood* 91: 2482–2490, (1998)

de Azevedo W.F, Mueller-Dieckmann HJM, Schulze-Gahmen U, Worland P, Sausville E, Kim SH, "Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2735–2740, (1996)

Banks P.M, Chan J, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Gatter K, Grogan TM, HarrisNL, Isaacson PG, Jaffe ES, Mason E, Pileri S, Ralfkiaer E, Stein H, Warnke RA, "Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data" *Am J Surg Pathol* 16: 637-640, (1992)

Berard C.W. und Dorfman R.F, "Histopathology of malignant lymphomas." *Clin Haematol* 3: 39-76, (1974)

Bergmann M.A, "Efficacy of bendamustine in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase I/II study of the German CLL Study Group" *Haematologica* 90: 1357, (2006)

Bernard M, Gressin R, Lerere F, "Blastic variant of mantle cell lymphoma: a rare but highly aggressive subtype" *Leukemia* 15: 1785-91, (2001)

Bertoni F, Zucca E, Cavalli F, "Mantle Cell Lymphoma" *Curr Opin Hematol* 11: 411–418, (2004)

Bertoni F, Rinaldi A, Zucca, E, Cavalli F, "Update on the molecular biology of mantle cell lymphoma." *Hematol Oncol* 24: 22-27, (2006).

Bible K.C, Kaufmann SH, "Flavopiridol: a cytotoxic flavone that induces cell death in noncycling A549 human lung carcinoma cells" *Cancer Res* 56: 4856–61, (1996)

Bible K.C, Kaufmann SH, „Cytotoxic synergy between flavopiridol (NSC 649890, L86-8275) and various antineoplastic agents: the importance of sequence of administration“ *Cancer Res* 15;57(16): 3375-80, (1997)

Bible K.C, Bible RHJ, Kottke TJ, "Flavopiridol binds to duplex DNA" *Cancer Res* 60: 2419–28, (2000)

de Boer C.J, Schuurin E, Dreef E, Peters G, Bartek J, Kluin PM, van Krieken JH, „Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma“ *Blood* 86(7): 2715-23. Oct (1995)

de Boer C.J, van Krieken JH, Kluin-Nelemans HC, "Cyclin D1 messenger RNA overexpression as a marker for mantle cell lymphoma" *Oncogene* 10: 1833-1840, (1999)

de Bondt H.L, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH, "Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2" *Nature* 363: 595–602, (1993)

Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E, Ribera JM, Conde E, Piris MA, Vallespi T, Woessner S, Montserrat E, "Mantle Cell Lymphoma: Presenting Features, Response to Therapy, and Prognostic Factors" *Cancer* 82(3): 567-75 (1998).

Bosch F, Jares P, Campo E, "PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: A highly specific marker of mantle cell lymphoma" *Blood* 84: 2726-2732, (1994)

Bosch F, Lopez-Guillermo,A, Campo E, Ribera JM, Conde E, Piris MA, Brody J, Ranjana A, "Treatment of mantle cell lymphoma: Current approach and future directions" *Crit Rev Oncol Hematol*. 58: 257-265, (2006)

Brody J, Ranjana A, „Treatment of mantle cell lymphoma: Current approach and future directions.“ *Crit Rev Oncol Hematol* 58: 257-265, (2006)



Brusselbach S, Nettelbeck DM, Sedlacek HH, Muller R, "Cell cycle-independent induction of apoptosis by the anti-tumor drug Flavopiridol in endothelial cells" *Int J Cancer* 77: 146–52, (1998)

Burdette-Radoux S, Tozer RG, Lohmann RC, "Phase II trial of flavopiridol, a cyclin dependent kinase inhibitor, in untreated metastatic malignant melanoma" *Invest New Drugs* 22: 315-322, (2004)

Byrd J.C, Peterson BL, Gabrilove J, "Treatment of relapsed chronic lymphocytic leukemia by 72-hour continuous infusion or 1-hour bolus infusion of flavopiridol: results from Cancer and Leukemia Group B study 19805" *Clin Cancer Res.* 11: 4176-4181, (2005)

Byrd J.C, Smith L, Hackbarth ML, "Interphase cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia may predict response to rituximab" *Cancer Res.* 63: 36-38, (2003)

Byrd J.C, Shinn C, Waselenko JK, Fuch EJ, Lehman TA, Nguyen PL, Flinn IW, Dieh LF, Sausville E, Grever MR, "Flavopiridol induces apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells via activation of caspase-3 without evidence of bcl-2 modulation or dependence on functional p53" *Blood* 92: 3804–16, (1998)

Byrd J.C, Lin T, Dalton JT, Wu D, Phelps MA, Fischer B, Moran MA, Colevas D, Johnson MRG, Lucas DM, Heerema NA, Lozanski G, Young DC, Suarez JR, Blum KA, Rovin B, Brooker-McEldowney M, Broering S, Schaaf LJ, Amy J, "Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukaemia" *Blood* 109: 399-404, (2006)

Byrd J.C, Phelps MA, Lin TS, Johnson AJ, Hurh E, Rozewski DM, Farley KL, Wu D, Blum KA, Fischer B, Mitchell SM, Moran ME, Brooker-McEldowney M, Heerema NA, Jarjoura D, Schaaf LJ, Grever MR, Dalton JT, "Clinical response and pharmacokinetics from a phase 1 study of an active dosing schedule of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia". *Blood* 113(12): 2637-45, (2009)

Camacho E, Hernandez L, Hernandez S, "ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances" *Blood* 99: 238-244, (2002)

Campo E, Raffeld M, Jaffe ES, "Mantle-cell lymphoma" *Semin Hematol* 36: 115-27, (1999).

Carlson B, Dubay MM, Sausville EA, Brizuela L, Worland PJ, "Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclindependent kinase (CDK)2 and CDK4 in human breast carcinoma cells" *Cancer Res.* 56: 2973–2978, (1996)

Carlson B, Pearlstein RA, Naik RG, Sedlacedk HH, Sausville EA, Worland PJ, "Inhibition of CDK2, CDK4 and CDK7 by flavopiridol and structural analogs" *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 37: A2897, (1996)

Carlson B, Lahusen T, Singh S, "Downregulation of cyclin D1 by transcriptional repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol" *Cancer Res.* 59: 4634–41, (1999)

Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Marchetti P, Macho A, Kroemer G, "Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis" *J Immunol* 157(2): 512-521, (1996).

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G, "Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition" *Oncogene* 23: 2825–2837, (2004)

Chan W.C. "Cyclin D1–negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling" *Blood* 106: 4315-4321, (2005)

Chao S.H, Price DH, "Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo" *J Biol Chem.* 276: 31793–9, (2001)

Chien M, Astumian M, Liebowitz D, Rinker-Schaeffer C, Stadler WM, „In vitro evaluation of flavopiridol, a novel cell cycle inhibitor, in bladder cancer" *Cancer Chemother Pharmacol* 44: 81–7, (1999)

Chen Y.N.P, Sharma SK, Ramsey TM, Jiang L, Martin MS, Baker K, Adams PD, Bair KW, Kaelin WG, "Selective killing of transformed cells by cyclin/cyclin-dependent kinase 2 antagonists" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 4325–4329, (1999)

Chen J, Lin J, Levine AJ, "Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene" *Mol Med* 1: 142-152, (1995)

Chou TC, Talalay P, „Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors" *Adv Enzyme Regul.* 22: 27-55, (1984)

Chou TC, Talalay P, "Generalized equations for the analysis of inhibitors of Michaelis-Menten and higher order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors" *Eur. J. Biochem.* 115: 207-216, (1981)

Chow K.U, Sommerlad WD, Boehrer S, et al: "Anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8, rituximab) enhances efficacy of cytotoxic drugs on neoplastic lymphocytes in vitro: Role of cytokines, complement, and caspases" *Haematologica* 87: 33-43, (2002)

Cordone J, Masi S, Mauro FR, et al. "p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis" *Blood* 91: 4342-4349, (1998)

Czech J, Hoffmann D, Naik R, Sedlacek HH, "Antitumoral activity of flavone L86-8275" *Int J Oncol.* 6: 31-6, (1995)

Demidenko Z, Blagsklonny M, "Flavopiridol Induces p53 via initial Inhibition of MDM2 and p21 and, independently of 53, sensitizes Apoptosis-Reluctant cells to Tumor Necrosis Factor" *Clinical Cancer Res.* 3653-3660, (2004)

Dohner H, Fischer K, Bentz M, et al. "p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias" *Blood* 85: 1580-1589, (1995)

Dreyling M, Bullinger L, Ott G, et al: "Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma" *Cancer Res.* 57: 4608-4614, (1997)

Dreyling M, Unterhalt M, Weigert O, Hiddemann W, "Therapy of mantle cell lymphoma" *Internist* 48: 382-388, (2007)

Dreyling M, Lenz G, Hoster E, Van Hoof A, Gisselbrecht C, Schmits R, Metzner B, Truemper L, Reiser M, Steinhauer H, Boiron JM, Boogaerts MA, Aldaoud A, Silingardi V, Kluin-Nelemans HC, Hasford J, Parwaresch R, Unterhalt M, Hiddemann W, "Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network" *Blood* 105: 2677-2684, (2005).

Dreyling M, Weigert O, Hiddemann W, „Current treatment standards and future strategies in mantle cell lymphoma“ *Ann of Oncol.* 19: 41-44, (2008)

Dyer MJ, Fischer P, Nacheva E, Labastide W, Karpas A, „A new human B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell line (Karpas 422) exhibiting both t(14;18) and t(4;11) chromosomal translocations“ *Blood* 75(3): 709-14, (1990)

Estrov Z, Talpaz M, Ku S, Harris D, Van Q, Beran M, Hirsch-Ginsberg C, Huh Y, Yee G, Kurzrock R „Z-138: a new mature B-cell acute lymphoblastic leukemia cell line from a patient with transformed chronic lymphocytic leukemia“ *Leuk Res.* 22(4): 341-53, (1998)

Fernandez V, Hartmann E, Ott G, Campo E, Rosenwald A, "Pathogenesis of Mantle-Cell Lymphoma: All Oncogenic Roads Lead to Dysregulation of Cell Cycle and DNA Damage Response Pathways" *J Clin Oncol* 23: 6364-6369, (2005)

Fingar D.C, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J, "Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E" *Genes Dev.* 16: 1472–1487, (2002)

Fisher R.I, "Mantle-cell lymphoma: classification and therapeutic implications" *Ann. Oncol.* 7: 35-39, (1996)

Fisher R.I, Bernstein SH, Kahl BS, Djulbegovic B, Robertson MJ, de Vos S, Epner E, Krishnan A, Leonard JP, Lonial S, Stadtmauer EA, O'Connor OA, Boral AL, Goy A, "Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma." *J Clin Oncol* 24(30): 4867-4874, (2006)

Fischer K, Stilgenbauer S, Schweighofer CD, et al. „Bendamustine in combination with rituximab (BR) for patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia (CLL): a multicentre phase II trial of the German CLL studygroup (GCLLSG)" *ASH Annual Meeting Abstracts* 110: 3106, (2007)

Flinn I.W, Byrd JC, Bartlett N, et al. "Flavopiridol administered as a 24-hour continuous infusion in chronic lymphocytic leukemia lacks clinical activity" *Leuk Res* 29: 1253-1257, (2005)

Forstpointner R, Dreyling M, Repp R, Hermann S, Hanel A, Metzner B, Pott C, Hartmann F, Rothmann F, Rohrberg R, Bock HP, Wandt H, Unterhalt M, Hiddemann W, "German Low-Grade Lymphoma Study Group. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group" *Blood* 104: 3064-3071, (2004)

Friedberg J.W, Cohen P, Chen L, et al: "Bendamustine in patients with rituximab-refractory and alkylator-refractory, indolent, and transformed non Hodgkin's lymphoma: Results from a phase II multicenter single-agent study" *J Clin Oncol* 26: 204-210, (2008)

Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Dave S, Wright G, Rosenwald A, Chiorazzi M, Iqbal J, Gesk S, Siebert R, De Jong D, Jaffe ES, Wilson WH, Delabie J, Ott G, Dave,BJ, Sanger WG, Smith LM, Rimsza L, Braziel RM, Müller-Hermelink HK, Campo E, Gascoyne RD, Staudt LM, "Cyclin D1–negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling" *Blood* 106: 4315-4321, (2005)

Gandhi V, "Metabolism and mechanisms of action of bendamustine: rationales for combination therapies" *Semin Oncol* 29: 4-11, (2002)

di Gaetano N, Xiao Y, Erba E, Bassan R, Rambaldi A, Golay J, Introna M. "Synergism between fludarabine and rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone" *Br J Haematol* 114: 800-809, (2001)

Georgakis G.V, Younes A, "From Rapa Nui to rapamycin: targeting PI3K/Akt/mTOR for cancer therapy" *Expert Rev Anticancer Ther* 6: 131-140, (2006)

Ghielmini M, Schmitz SF, Cogliatti S, Bertoni F, Waltzer U, Fey MF, Betticher DC, Schefer H, Picher, G, Stahel R, Ketterer N, Bargetzi M, Cerny T, "Effect of single-agent rituximab given at the standard schedule or as prolonged treatment in patients with mantle cell lymphoma: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK)" *J Clin Oncol* 23: 705-711, (2005)

Giovanni A, Wirtz-Brugger F, Keramaris E, Slack R, Park DS, "Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent kinases, pRb and E2F DP, in B-amyloid-induced neuronal death" *J Biol Chem* 274: 19011-6, (1999)

Gopal A.K, Rajendran JG, Petersdorf SH, et al. "High-dose chemo-radioimmunotherapy with autologous stem cell support for relapsed mantle cell lymphoma" *Blood* 99: 3158-3162, (2002)

Gojo I, Zhang B, Fenton R, "The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1" *Clin Cancer Res.* 8: 3527-38, (2002)

Gokmen-Polar Y, Murray NR, Velasco MA, Gatalica Z, Fields AP, "Elevated protein kinase C  $\beta$ II is an early promotive event in colon carcinogenesis" *Cancer Res.* 61: 1375-81, (2001)

Greiner T.C, Moynihan MJ, Chan WC, et al. "p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis" *Blood* 87: 4302-4310, (1996)

Gronbaek K, Nedergaard T, Andersen MK, et al. "Concurrent disruption of cell cycle associated genes in mantle cell lymphoma: A genotypic and phenotypic study of cyclin D1, p16, p15, p53 and pRb" *Leukemia* 12: 1266-1271, (1998)

Guan K.L, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y, "Growth suppression by p18, a p16INK4:MTS1- and p14 INK4B:MTS2-related cdk6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function" *Genes Dev* 8: 2939-52, (1994)

Hall M, Peters G, "Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and cdk inhibitors in human cancer" *Adv Cancer Res.* 68: 67-108, (1996)

Hanahan D, Weinberg R.A. "The hallmarks of cancer" *Cell* 100:57-70, (2000)

Hangaishi A, Ogawa S, Qiao Y, Wang L, Hosoya N, Yuji K, Imai Y, Takeuchi K, Miyawaki S, Hirai H, "Mutations of *Chk2* in primary hematopoietic neoplasms." *Blood* 99: 3075-3077, (2002)

Harbour J.W, Dean DC, "The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms" *Genes Dev.* 14: 2393–2409, (2000)

Harris S, Levine L, "The p53 pathway: positive and negative feedback loops" *Oncogene* 24: 2899-2908, (2005)

Hashemolhosseini S, Nagamine Y, Morley SJ, Desrivieres S, Mercep L, Ferrari S, "Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability" *J Biol Chem* 273: 14424–14429, (1998)

Hartmann M, Zimmer C, "Investigation of cross-link formation in DNA by the alkylating cytostatic IMET 3106, 3393 and 3943" *Biochim Biophys Acta* 287: 386-9, (1972)

Hecker D, Page G, Lohrum M, Weiland S, Scheidtmann KH, „Complex regulation of the DNA-binding activity of p53 by phosphorylation: differential effects of individual phosphorylation sites on the interaction with different binding motifs" *Oncogene* 12: 953–61, (1996)

Heinrich P.C, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L, "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/ Jak/STAT pathway" *Biochem. J.* 334: 297–314, (1998)

Hernandez L, Fest T, Cazorla M, Teruya-Feldstein J, Bosch F, Peinado MA, Piris MA, Montserrat E, Cardesa A, Jaffe ES, Campo E, Raffold M, "p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas" *Blood* 87: 3351-3359, (1996)

Herrmann A, Hoster E, Zwingers T, Brittinger G, Engelhard M, Meusers P, Reiser M, Forstpointner R, Metzner B, Peter N, Wörmann B, Trümper L, Pfreundschuh M, Einsele M, Hiddemann W, Unterhalt M, Dreyling M, „Improvement of Overall Survival in Advanced Stage Mantle Cell Lymphoma" *JCO* 27 4: 511-518, (2009)

Hiddemann W, Dreyling M, Pfreundschuh M, Gisselbrecht C, Diehl V, Boiron JM, Trümper L, Illiger HJ, Rudolph C, Boogaerts M, Kluin-Nelemans H, Parwaresch R, Unterhalt M, "Myeloablative Radiochemotherapy Followed by Autologous Blood Stem Cell Transplantation Leads to a Significant Prolongation of the Event-Free Survival in Patients with Mantel Cell Lymphoma (MCL): Results of a Prospective Randomized European Intergroup Study" *Blood* 98: 861a, (2001)

Hiddemann W, Dreyling M, "Mantle cell lymphoma: therapeutic strategies are different from CLL" *Curr Treat Options Oncol* 4:219-226, (2003)

Hirama T, Koeffler H.P., "Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer" *Blood* 86: 841-854, (1995)

Hirschberg E, Gellhorn A, Gump WS, "Laboratory evaluation of a new nitrogen mustard, 2-[di-(2-chlorethyl) aminomethyl] benzimidazole and of other 2-chlorethyl compounds" *Cancer Res.* 17: 904 - 10, (1957)

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC, "p53 mutations in human cancers" *Science* 253: 49-53, (1991)

Hofter E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, van Hoof A, Kluin-Nelemans HC, Pfreundschuh M, Reiser M, Metzner B, Einsele H, Peter N, Jung W, Wörmann B, Ludwig WD, Dührsen U, Eimermacher H, Wandt H, Hasford J, Hiddemann W, Unterhalt M, "A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma" *Blood* 111; 2: 558-565, (2008)

Hunter T, Pines J, "Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age" *Cell* 79: 573-582, (1994)

Hutter G, Nickenig C, Garritsen H, Hellenkamp F, Hoerning A, Hiddemann W, Dreyling M, "Use of polymorphisms in the noncoding region of the human mitochondrial genome to identify potential contamination of human leukemia-lymphoma cell lines" *Hematol J.* 5: 61-68, (2004)

Jaffe E.S, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds.) "World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues" IARC Press, Lyon, (2001)

Jeon HJ, Kim CW, Yoshino T, Akagi T, "A mantle cell lymphoma (MCL) cell line established from peripheral blood mononuclear cells of a patient with a large cell variant of MCL showing leukaemic conversion" *Br J Haematol* 102(5): 1323-6, (1998)

Jeremy R.G, McNulty A, Ross H, Konicek B, Lynch R, Bailey S, Banks C, Capen A, Goode R, Lewis J, Sams L, Huss KL, Campbel RMI, Iversen PW, Neubauer BL, Brown TJ, Musib L, "The Protein Kinase CB-Selective Inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), Suppresses Signaling through the AKT Pathway, Induces Apoptosis, and Suppresses Growth of Human Colon Cancer and Glioblastoma Xenografts" *Cancer Res.* 65: 16, (2005)

Kaufmann H, Raderer M, Wohrer S, Puspok A, Bankier A, Zielinski C, Chott A, Drach J, "Antitumor activity of rituximab plus thalidomide in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma" *Blood* 104: 2269-2271, (2004)

Keating M, Bach C, Yasothan U, Kirkpatrick P; "Bendamustine" Volume 7 Nature Publishing Group, (2008)

Khoury I.F, Lee MS, Saliba RM, Jun G, Fayad L, Younes A, Pro B, Acholonu S, McLaughlin P, Katz RL, Champlin RE, "Nonablative allogeneic stem-cell transplantation for advanced/recurrent mantle-cell lymphoma" *J Clin Oncol* 21: 4407-4412, (2003)

Koppler H, Heymanns J, Pandorf A, Weide R, "Bendamustine plus mitoxantrone—a new effective treatment for advanced chronic lymphocytic leukaemia: results of a phase I/II study" *Leuk Lymphoma* 45: 911-913, (2004)

Korz C, Pscherer A, Stilgenbauer S, Lichter P, „Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes" *Blood* 99: 4554-4561, (2002)

Kouroukis T, Belch A, Crump M, Eisenhauer E, Gascoyne RD, Meyer R, Lohmann P, Powers J, Turner R, Connors JM, "Flavopiridol in Untreated or Relapsed Mantle-Cell Lymphoma: Results of a Phase II Study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group" *Clin Oncol* 21: 1740-1745, (2003)

Knudsen E.S, Buckmaster C, Chen TT, Feramisco JR, Wang JYJ, "Inhibition of DNA synthesis by RB: effects on G1-S transition and S-phase progression" *Genes Dev.* 12: 2278–2292, (1998)

Krek W, Ewen ME, Shirodkar S, Arany Z, Kaelin WG, Livingston DM, "Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase" *Cell* 78: 161–172, (1994)

Lam L.T, Pickeral OK, Peng AC, et al. "Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol" *Genome Biol* 2 10: 0041, (2001)

Larocca L.M, Piantelli M, Leone G, Sica S, Teofili L, Benedetti-Panici P, Scambia G, Mancuso S, Capelli A, Ranelletti FO, "Type II oestrogen binding sites in acute lymphoid and myeloid leukemias: Growth inhibitory effect of oestrogen and flavonoids" *Br J Haematol* 75: 489, (1990)

Larocca L.M, Piantelli M, Leone G, Sica S, Teofili L, Benedetti- Panici P, Scambia G, Mancuso S, Capelli A, Ranelletti FO, "Antiproliferative activity of quercetin on normal bone marrow and leukemic progenitors" *Br J Haematol* 79: 562, (1991)



Lennert K, Stein H, Kaiserling E. „Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata“ *Br J Cancer* 31 (2): 29-43, (1975)

Lenz G, Dreyling M, Hiddemann W, “Mantle cell lymphoma: established therapeutic options and future directions” *Ann Hematol* 83(2): 71-77, (2004)

Lenz G, Dreyling M, Hoster A, Wörmann B, Dührsen U, Metzner B, Eimermacher H, Neubauer A, Wandt H, Steinhauer H, Martin S, Heidemann E, Aldaoud A, Parwaresch R, Hasford J, Unterhalt M, Hiddemann W, „Immunochemotherapy With Rituximab and Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Significantly Improves Response and Time to Treatment Failure, But Not Long-Term Outcome in Patients With Previously Untreated Mantle Cell Lymphoma: Results of a Prospective Randomized Trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG)“ *Journal of Clinical Oncology* 23 (9):1984-1992, (2005)

Leoni L.M, Bailey B, Niemeyer CC, et al. “In vitro and ex vivo activity of SDX-105 (bendamustine) in drug-resistant lymphoma cells” *AACR Meeting Abstracts* 278-b, (2004)

Leoni M, Bailey B, Reifert J, Bendall HH, Zeller R, Corbeil J, Elliott G, Niemeyer CC, “Bendamustine (Treanda) Displays a Distinct Pattern of Cytotoxicity and Unique Mechanistic Features Compared with Other Alkylating Agents” *Clin Cancer Res* 1; 14(1): 309-17. (2008)

Levine A.J, Momand J, Finlay CA, “The p53 tumour suppressor gene” *Nature* 351: 453–6, (1991)

Levy V, Ugo V, Delmer A, Tang R, Ramond S, Perrot JY, Vrhovac R, Marie JP, Zittoun R, Ajchenbaum-Cymbalista F, “Cyclin D1 overexpression allows identification of an aggressive subset of leukemic lymphoproliferative disorder” *Leukemia* 13: 1343-1351, (1999)

Lin T.S, Howard OM, Neuberg DS, Kim HH, Shipp MA, “Seventy-two hour continuous infusion flavopiridol in relapsed and refractory mantle cell lymphoma” *Leuk Lymphoma* 43: 793-797, (2002)

Lin T.S, Ruppert A, Johnson A, Fischer B, Heerema N, Andritsos L, Blum K, Flynn J, Jones J, Hu W, Moran E, Mitchell S, Smith L, Wagner A, Raymond C, Schaaf L, Phelps MA, Villalona-Calero M, Grever M, Byrd JC, “Phase II Study of Flavopiridol in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia Demonstrating High Response Rates in Genetically High-Risk Disease “ *JCO* 22: 6944v1, (2009)

Lissitchkov T, Arnaudov G, Peytchev D, Merkle K, “Phase I/II study to evaluate dose limiting toxicity, maximum tolerated dose, and tolerability of bendamustine HCl in pre-treated patients with B-chronic lymphocytic leukaemia (binet stages B and C) requiring therapy” *J Cancer Res Clin Oncol* 132: 99-104, (2006)

Louie D.C, Offit K, Jaslow R, et al. "p53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q13;q32)" *Blood* 86: 2892-2899, (1995)

Liu G, Gandara DR, Lara PN Jr, et al. „A phase II trial of flavopiridol (NSC #649890) in patients with previously untreated metastatic androgen-independent prostate cancer" *Clin Cancer Res.* 10: 924-928, (2004)

Majlis A, Pugh W, Rodriguez M, Benedict W, Cabanillas F, "Mantle cell lymphoma: correlation of clinical outcome and biologic features with three histologic variants" *J Clin Oncol* 15: 1664-1671, (1997)

Majewski M, Korecka M, Kossev P, et al. „The immunosuppressive macrolide RAD inhibits growth of human Epstein–Barr virus-transformed B lymphocytes in vitro and in vivo: potential approach to prevention and treatment of posttransplant lymphoproliferative disorders" *Proc Natl Acad* 97(8): 4285–90, (2000)

Malumbres M, Barbacid M, "Mammalian cyclin-dependent kinases" *Trends Biochem. Sci.* 30: 630–641, (2005)

Matranga C.B, Shapiro G, "Selective Sensitization of Transformed Cells to Flavopiridol-induced Apoptosis following Recruitment to S-Phase1" *Cancer Res* 62: 1707–1717, (2002)

Melo JV, Foroni L, Brito-Babapulle V, Luzzatto L, Catovsky D, „The establishment of cell lines from chronic B cell leukaemias: evidence of leukaemic origin by karyotypic abnormalities and Ig gene rearrangement" *Clin Exp Immunol* 73(1): 23-8, (1988)

von Minckwitz G, Chernozemsky I, Sirakova L, et al. „Bendamustine prolongs progression-free survival in metastatic breast cancer (MBC): a phase III prospective, randomized, multicenter trial of bendamustine hydrochloride, methotrexate and 5-fluorouracil (BMF) versus cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF) as first-line treatment of MBC" *Anticancer Drugs* 16: 871, (2005)

Monni O, Oinonen R, Elonen E, et al. "Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma" *Genes Chromosomes Cancer* 21: 298-307, (1998)

Monks A, Scudiero D, Skehan P, et al. "Feasibility of a high-flux anticancer screen using a diverse panel of cultured human tumor lines" *J Natl Cancer Inst* 83: 757-66, (1991)

Morgan D.O, "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors" *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 261-291, (1997)

Motokura T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A, "A cyclin encoded by a *bcl1*-linked candidate oncogene" *Nature* 350: 512-515, (1991).

Motwani M, Jung C, Sirotnak FM, et al. "Augmentation of apoptosis and tumor regression by flavopiridol in the presence of CPT-11 in Hct116 colon cancer monolayers and xenografts" *Clin Cancer Res.* 7: 4209–19, (2001)

Müller R, Mumberg D, Lucibello FC, "Signals and genes in the control of cell-cycle progression" *Biochim Biophys Acta* 1155: 151–79, (1993)

Nanba K, Jaffe ES, Braylan RC, Soban EJ, Berard CW, „Alkaline phosphatase-positivemalignant lymphoma" *Am J Clin Pathol* 68: 535-542, (1977)

Nakamura S, "Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma" *Blood* 95: 2253-2261, (2000).

Neubauer A, Wandt H, Steinhauer H, Martin S, Heidemann E, Aldaoud A, Parwaresch R, Hasford J, Unterhalt M, Hiddemann W, "Immunochemotherapy With Rituximab and Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Significantly Improves Response and Time to Treatment Failure, But Not Long-Term Outcome in Patients With Previously Untreated Mantle Cell Lymphoma: Results of a Prospective Randomized Trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG)" *J Clin Oncol* Jan 24, (2005)

Newcomb E.W, Tamasdan C, Entzminger Y, et al. "Flavopiridol inhibits the growth of GL261 gliomas in vivo: implications for malignant glioma therapy" *Cell Cycle* 3: 230–4, (2004)

Otterson G.A, Kratzke RA, Coxon A, Kim YW, Kaye FJ, "Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB" *Oncogene* 9: 3375–3378, (1994)

Ozegowski W, Krebs D, "IMET 3393, (-[1-methyl-5-bis-(chloroethyl)-amino-benzimidazolyl-(2)]-butyric) acid hydrochloride, a new cytostatic agent from among the series of benzimidazole mustard compounds" *Zbl Pharm* 110: 1013-9, (1971)

Parker B.W, Kaur G, Nieves-Neira W, Taimi M, Kohlhagen G, Shimizu T, Losiewicz MD, Pommier Y, Sausville EA, Senderowicz AM, "Early induction of apoptosis in hematopoietic cell lines after exposure to Flavopiridol" *Blood* 91: 458–65, (1998)

Patel V, Senderowicz AM, Pinto J, Igishi T, Raffeld M, Quintanilla-Martinez L, Ensley JF, Sausville EA, Gutkind JS, "Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, suppresses the growth of head and neck squamous cell carcinomas by inducing apoptosis" *J. Clin. Investig* 102: 1674–1681, (1998)

Peggs K.S, Mackinnon S, Linch DC, "The role of allogeneic transplantation in non-Hodgkin's lymphoma" *Br J Haematol* 128: 153-68, (2005)

Phelps M, Heerema NA, Jarjoura D, Schaaf L, Byrd JC, Grever MR, Dalton JT, Wu D, Blum C, Fischer B, Mitchell S, Moran M, Booker-McEldowne M, Lin T, Johnson A, Hurh E, Rozewski D, Farle K "dosing schedule of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukaemia Clinical response and pharmacokinetics from a phase I study of an activedosing schedule of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia" *Blood* 07: 168583, (2008)

Phillips A.C, Vousden KH, "E2F-1 induced apoptosis" *Apoptosis* 6: 173–182, (2001)

Pines J, "Cyclins: wheels within wheels" *Cell Growth Differ* 2: 305–10, (1991)

Pinyol M, Cobo F, Beà S, Jares P, Nayach I, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A, Campo E, "p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas" *Blood* 91: 2977-2984, (1998)

Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, et al: "The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53" *Cell* 92: 713-723, (1998)

Ponisch W, Mitrou PS, Merkle K, et al. "Treatment of bendamustine and prednisone in patients with newly diagnosed multiple myeloma results in superior complete response rate, prolonged time to treatment failure and improved quality of life compared to treatment with melphalan and prednisone. A randomized phase III study of the East German Study Group of Hematology and Oncology" *J Cancer Res Clin Oncol* 132: 205, (2006)

Ponzoni M, „The cellular origin of mantle cell lymphoma“ *Int J Biochem CellBiol* 39: 1747-1753, (2007)

Press O.W. Treatment of mantle-cell lymphoma: Stem-cell transplantation, radioimmunotherapy, and management of mantle-cell lymphoma subsets" *American Society of Clinical Oncology* 407-415, (2002)

Rimokh R, Berger F, Bastard C, et al. "Rearrangement of CCND1 (BCL1/PRAD1) untranslated region in mantle-cell lymphomas and t(11q13)-associated leukaemia" *Blood* 83: 3689-3696, (1994)

Reynolds C.P, Maurer B.J, "Methods in Molecular Medicine", Chemosensitivity, In Vitro Assays: 173-183, (1997)

Robinson S.P, Goldstone AH, Mackinnon S, Carella A, Russell N, de Elvira CR, Taghipour G, Schmitz N. "Chemoresistant or aggressive lymphoma predicts for a poor outcome following reduced-intensity

*allogeneic progenitor cell transplantation: an analysis from the Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation” Blood 100: 4310-4316, (2002)*

*Robinson K.S, Williams ME, van der Jagt RH, “Phase II multicenter study of bendamustine plus rituximab in patients with relapsed indolent B-cell and mantle cell non-Hodgkin’s lymphoma” J Clin Oncol; 26: 4473-4479, (2008)*

*da Rocha A.B, Mans DR, Regner A, Schwartzmann G, “Targeting protein kinase C: new therapeutic opportunities against high-grade malignant gliomas” Oncologist 7: 17–33, (2002)*

*Rosenberg CL, Wong E, Petty EM, Bale AE, Tsujimoto Y, Harris NL, Arnold A, „PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma PNAS“, Proc Natl Acad Sci U S A. 88(21): 9638, (1991)*

*Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, Gascoyne RD, Grogan TM, Müller-Hermelink HK, Smeland EB, Chiorazzi M, Giltnane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Henrickson S, Yang L, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Montserrat E, Bosch F, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Fisher RI, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Staudt LM, “The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma” Cancer Cell 3: 185-197, (2003)*

*Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, et al: “The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma” Cancer Cell 3: 185-197, (2003)*

*Roue G, Lopez-Guerra M, Milpied P, Perez-Gala P, Villamor N, Montserrat E, Campo E, Colomer D, “Bendamustine Is Effective in p53-Deficient B-Cell Neoplasms and Requires Oxidative Stress and Caspase-Independent” Signaling Clin Cancer Res 14: 6907, (2008)*

*Rudolph C, Steinemann D, Von Neuhoff N, Gadzicki D, Ripperger T, Drexler HG, Mrasek K, Liehr T, Claussen U, Emura M, Schrock E, Schlegelberger B, „Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519“ Cancer Genet Cytogenet. 153(2): 144-50, (2004)*

*Rummel M.J, “Bendamustine plus rituximab is effective and has a favorable toxicity profile in the treatment of mantle cell and low-grade non-Hodgkin’s lymphoma” J Clin Oncol 23: 3383-9, (2005)*

*Rummel M.J, Mitrou PS, Hoelzer D, “Bendamustine in the treatment of non-Hodgkin’s lymphoma: results and future perspectives” Semin Oncol 29: 27-32, (2002)*

Rummel M.J., Chow KU, Hoelzer D, Mitrou PS, Weidmann E, "In vitro studies with bendamustine: enhanced activity in combination with rituximab" *Semin Oncol* 29: 12-14, (2002)

Rummel M.J., Niederle M, Maschmeyer G, Banat A, von Gruenhagen U, Losem C, Heil G, Welslau M, Balsler C, Kaiser U, Ballo H, Weidmann E, Duerk HA, Kofahl-Krause D, Roller F, Barth J, Hoelzer D, Hinke A, Brugger W, „Bendamustine Plus Rituximab Is Superior in Respect of Progression Free Survival and CR Rate When Compared to CHOP Plus Rituximab as First-Line Treatment of Patients with Advanced Follicular, Indolent, and Mantle Cell Lymphomas: Final Results of a Randomized Phase III Study of the StiL (Study Group Indolent Lymphomas, Germany)“ *Blood*; 114: Abstract 405 (2009)

Salaverria J., Perez-Galan P, Colomer D, Campo E, "Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives" *Haematologica* 90: 11-16, (2006)

Saltman D.L., Cachia PG, Dewar AE, Ross FM, Krajewski AS, Ludlam C, Steel CM. „Characterization of a new non-Hodgkin's lymphoma cell line (NCEB-1) with a chromosomal (11:14) translocation [t(11:14)(q13;q32)]“ *Blood* 72(6): 2026-30, (1988)

Sausville E.A., "Cell cycle regulatory kinase modulators: interim progress and issues" *Curr Top MedChem* 5: 1109-1117, (2005)

Sawyers C., "Targeted cancer therapy" *Nature* 432: 294-2, (2004)

Schaffner C., Idler I, Stilgenbauer S, et al: "Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene" *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2773-2778, (2000)

Shapiro G.I., Koestner DA, Matranga CB, Rollins BJ, „Flavopiridol induces cell cycle arrest and p53-independent apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines“ *Clin Cancer Res* 5(10): 2925-38, (1999)

Shapiro GI., "Preclinical and Clinical Development of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol" *Clin Cancer Res* 10: 4270, (2004)

Sherman E.J., Senderowicz AM, Headlee D, Stinson EF, Lush RM, Kalil N, Villalba L, Hill K, Steinberg SM, Figg WD, Tompkins A, Arbus SG, Sausville EA, "Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin- dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms" *Journal of Clinical Oncology* 16: 2986-2999, (1998)

Schmittel A., "Phase II trial of second-line bendamustine chemotherapy in relapsed small cell lung cancer patients" *Lung Cancer* 55: 109-13, (2007)

Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G, "Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma" *Int J Cancer* 19(5): 621-6, (1977)

Schrump D.S, Matthews W, Chen GA, Mixon A, Altorki NK. "Flavopiridol mediates cell cycle arrest and apoptosis in esophageal cancer cells" *Clin Cancer Res* 4: 2885–90, (1998)

Schwartz G.K, Farsi K, Daso D, et al. "The protein kinase C (PKC) inhibitors UCN-01 and Flavopiridol (FLAVO) significantly enhance the cytotoxic effect of chemotherapy by promoting apoptosis in gastric and breast cancer cells" *Proc AmSoc Oncol* 15: 501, (1996)

Schwartz G.K, Ilson D, Saltz L, et al. "Phase II study of the cyclindependent kinase inhibitor flavopiridol administered to patients with advanced gastric carcinoma" *J Clin Oncol* 19: 1985-1992, (2001)

Schwartz G.K, O'Reilly E, Ilson D, et al. "Phase I study of the cyclindependent kinase inhibitor flavopiridol in combination with paclitaxel in patients with advanced solid tumors" *J Clin Oncol* 20: 2157-2170, (2002)

Sedlacek H, Czech J, Naik R, Kaur G, Worland P, Losiewicz M, Parker B, Carlson B, Smith A, Senderowicz A, Sausville E, "Flavopiridol (L868 275; NSC649 890), a new kinase inhibitor for tumor therapy" *Int J Oncol* 9: 1143, (1996)

Sedlacek H, "Mechanisms of action of flavopiridol" *Critical Reviews in Oncology: Hematology* 38: 139–170, (2001)

Senderowicz A.M. "Inhibitors of cyclin-dependent kinase modulators for cancer therapy" *Prog Drug Res.* 63: 183-206, (2005)

Senderowicz A.M, Headlee D, Stinson SF, et al. "Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms" *J Clin Oncol* 16: 2986, (1998)

Serrano M, Hannon GJ, Beach D, "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4" *Nature* 366: 704-707, (1993)

Shapiro G.I, Koestner DA, Sausville EA, Rollins BJ, "Flavopiridol-mediated cdk inhibition results in p53-independent apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines" *Proc Am Assoc Cancer Res* 39: 70, (1998)

Shapiro G.I, Supko JG, Patterson A, et al. "A phase II trial of the cyclindependent kinase inhibitor flavopiridol in patients with previously untreated stage IV non-small cell lung cancer" *Clin Cancer Res* 7: 1590-1599, (2001)

Sherr C.J, Roberts JM, "Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases" *Genes Dev.* 9: 1149–63, (1995)

Sherr C.J. "Cancer cell cycles" *Science* 274: 1672-1677, (1996)

Sherr C.J, Roberts JM, "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression" *Genes Dev.* 13: 1501–12, (1999)

Shibu T, Suzuki S, Okamoto H, Yoshida H, Ohba Y, Takaoka Q, Taniguchi T, " Differential contribution of Puma and Noxa in dual regulation of p53-mediated apoptotic pathways" *EMBO J.* 25(20): 4952–4962, (2006)

Shipp M.A, Ross KN, Tamayo P, et al. "Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning" *Nat Med* 8: 68–74, (2002)

Stadler W.M, Vogelzang NJ, Amato R, et al. "Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in metastatic renal cancer: a University of Chicago Phase II Consortium study" *J Clin Oncol* 18: 371-375, (2000)

Stiewe T, "The p53 family in differentiation and tumorigenesis" *Nature Reviews Cancer* 7: 165-168, (2007)

Stilgenbauer S, Winkler D, Ott G, et al. "Molecular characterization of 11q deletions points to a pathogenic role of the ATM gene in mantle cell lymphoma" *Blood* 94: 3262-3264, (1999)

Strumberg D, Harstrick A, Doll K, Hoffmann B, Seeber S, "Bendamustine hydrochloride activity against doxorubicin-resistant human breast carcinoma cell lines" *Anticancer Drugs* 4: 415-21, (1996)

Swerdlow S.H, Habeshaw JA, Murray LJ, Dhaliwal HS, Lister TA und Stansfeld AG, "Centrocytic lymphoma: a distinct clinicopathologic and immunologic entity. A multiparameter study of 18 cases at diagnosis and relapse" *Am J Pathol* 113: 181-197, (1983)

Swerdlow S.H, Yang WJ, Zukerberg LR, Harris NL, Arnold A und Williams ME, "Expression of cyclin D1 protein in centrocytic/mantle cell lymphomas with and without rearrangement of the BCL1/cyclin D1 gene" *Hum Pathol* 26: 999-1004, (1995)



Swerdlow S.H, Williams ME, "From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades" *Hum Pathol* 33: 7-20, (2002)

Tetsu O, McCormick F, "Proliferation of cancer cells despite cdk2 inhibition" *Cancer Cell* 3: 233-45, (2003)

Thomas J.P, Tutsch KD, Cleary JF, et al. "Phase I clinical and pharmacokinetic trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol" *Cancer Chemother Pharmacol* 50: 465-72, (2002)

Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling M, Campo E, Norton A, Berger F, Klun P, Ott G, Pileri S, Pedrinis E, Feller AC, Merz H, Janssen D, Hansmann ML, Krieken H, Möller P, Stein H, Unterhalt M, Hiddemann W, Parwaresch R, "Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network" *Br J Haematol* 131: 29-38, (2005)

Tort, F, Hernandez S, Bea S, Camacho E, Fernandez V, Esteller M, Fraga MF, Burek C, Rosenwald A, Hernandez L, Campo E, "Checkpoint kinase 1 (CHK1) protein and mRNA expression is downregulated in aggressive variants of human lymphoid neoplasms" *Leukemia* 19: 112-117, (2005)

Vallespi T, Woessner S, Montserrat E, "Mantle Cell Lymphoma: Presenting Features, Response to Therapy, and Prognostic Factors" *Cancer* 82(3): 567-75, (1998)

Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, et al. "p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies" *Blood* 84: 3148-3157, (1994)

Webb J.L. "Effect of more than one inhibitor" *Enzyme and metabolic inhibitors* 1: 487-512. (1963)

Weide R, Pandorf A, Heymanns J, Koppler H, "Bendamustine/mitoxantrone/rituximab (BMR): a very effective, well tolerated outpatient chemoimmunotherapy for relapsed and refractory CD20-positive indolent malignancies. Final results of a pilot study" *Leuk Lymphoma* 45: 2445-2449, (2004)

Weisenburger D.D, Kim H, Rappaport H, "Mantle-zone lymphoma: a follicular variant of intermediate lymphocytic lymphoma" *Cancer* 49: 1429-1438, (1982)

Weisenburger D.D und Armitage J.O. "Mantle cell lymphoma - an entity comes of age" *Blood* 87: 4483-4494, (1996)

Weisenburger D, Vose J, Greiner T, et al. "Mantle cell lymphoma: A clinicopathologic study of 68 cases from the Nebraska Lymphoma Study Group" *Am J Hematol* 64: 190-196, (2000)

Williams M.E, Densmore JJ, "Biology and therapy of mantle cell lymphoma" *Curr Opin Oncol* 17: 425-43, (2005)

Withers D.A, Harvey RC, Faust JB, Melnyk O, Carey, Meeker TC, "Characterization of a candidate *bcl-1* gene" *Mol Cell Biol* 11: 4846-4853, (1991)

Wittmann S, Bali P, Donapaty S, et al. "Flavopiridol down-regulates antiapoptotic proteins and sensitizes human breast cancer cells to epothilone B-induced apoptosis" *Cancer Res.* 63: 93–9, (2003)

Witzig T.E, "Current Treatment Approaches for Mantle-Cell Lymphoma" *J Clin Oncol* 23: 6409-6414. (2005)

Witzig T.E, Geyer SM, Ghobrial I, Inwards DJ, Fonseca R, Kurtin P, Ansell SM, Luyun R, Flynn PJ, Morton RF, Dakhil SR, Gross H, Kaufmann SH, "Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma" *J Clin Oncol* 23: 5347-5356, (2005)

Wong K.F, Chan JK, So JC, Yu PH, "Mantle cell lymphoma in leukemic phase: characterization of its broad cytologic spectrum with emphasis on the importance of distinction from other chronic lymphoproliferative disorders" *Cancer* 86: 850-857, (1999)

Woolley D, "Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines" *J Biol Chem* 152: 225-32, (1944)

Yatabe Y, Suzuki R, Tobinai K, Matsuno Y, Ichinohasama R, Okamoto M, Yamaguchi M, Tamaru J, Uike N, Hashimoto Y, Morishima Y, Suchi T, Seto M, Nakamura S, "Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma" *Blood* 95: 2253-2261, (2000)

Zhou B.B, Elledge SJ: "The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective" *Nature* 408: 433-439, (2000)

Zoya N, Blagosklonny M, "Flavopiridol Induces p53 via Initial Inhibition of Mdm2 and p21 and, Independently of p53, Sensitizes Apoptosis-Reluctant Cells to Tumor Necrosis Factor" *Cancer Research* 64: 3653–3660, (2004)

Zucca E, Roggero E, Pinotti G, Pedrinis E, Cappella C, Venco A, Cavalli F, "Patterns of survival in mantle cell lymphoma" *Ann Oncol* 6: 257-262, (1995)

TJW2012