

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

***Die Kombination von Hyperthermie und Bortezomib im
Mantelzelllymphom***

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

vorgelegt von

Monika Lorenz

aus Aichach

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. dipl. biochem. Rolf Dieter Issels

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Irene Schmid
Priv. Doz. Dr. Christian Straka

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Valeria Milani

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

Tag der mündlichen Prüfung: 01.03.2012

Für
Mama und Sina

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben.

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. dipl. biochem. Rolf Dieter Issels für die Bereitstellung des Forschungsprojekts sowie der nötigen Mittel zur Durchführung dieser Arbeit und seinem Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Valeria Milani; durch sie wurde die Erstellung dieser Arbeit erst möglich. Mit Geduld und Rat stand sie mir in der gesamten Zeit zur Seite und unterstützte mich mit ihrer unentbehrlichen Hilfsbereitschaft in allen Phasen dieser Arbeit sowie bei der Veröffentlichung der erzielten Ergebnisse.

Ich möchte des Weiteren der KKG Hyperthermie für die außerordentlich gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Atmosphäre danken. Insbesondere danke ich Doreen Hammer, Claudia Mayerhofer, Birgit Sirch, Henriette Bendz sowie Maria Kuppner für die tatkräftige und ausdauernde Unterstützung bei der Lösung technischer und fachlicher Probleme.

Auch die gute Zusammenarbeit mit der KKG Leukämie, hierbei insbesondere Marc Weinkauff, Alessandro Pastore und Martin Dreyling, verhalf mir stets zum Fortschritt mit meiner Arbeit und werde ich in guter Erinnerung behalten.

Insbesondere danke ich auch meiner Familie, die zu jedem Zeitpunkt hinter mir stand und mich in allen Situationen unterstützte sowie meinen Freunden, auf die auch trotz mancher Entfernung immer Verlass war.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	4
Inhaltsverzeichnis	5
Verzeichnis der Abbildungen	9
Verzeichnis der Tabellen	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	14
1.1 Das Mantelzelllymphom	14
1.1.1 Klassifikation und klinische Manifestation	14
1.1.2 Morphologie, Phänotyp und Pathogenese	15
1.1.3 Aktuelle Therapiestandards des Mantelzelllymphoms	18
<i>1.1.3.1 Chemotherapie und die Anwendung von Rituximab</i>	18
<i>1.1.3.2 Bestrahlung</i>	20
<i>1.1.3.3 Radioimmuntherapie</i>	20
<i>1.1.3.4 Autologe und allogene Stammzelltransplantation</i>	21
<i>1.1.3.5 Neue Therapieansätze des Mantelzelllymphoms</i>	22
1.2 Bortezomib	25
1.2.1 Das Proteasom – Struktur und Funktion	25
1.2.2 Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib	28
1.2.3 Wirkungsweise von Bortezomib	29
1.2.4 Klinische Anwendung von Bortezomib im Mantelzelllymphom	31

1.3 Hyperthermie	33
1.3.1 Grundlagen und biologische Rationale der Hyperthermie	33
1.3.2 Die Hitzeschockproteine	35
1.3.2.1 <i>Hsp70</i>	37
1.3.2.2 <i>Hsp90</i>	37
1.3.2.3 <i>Hsp27</i>	37
1.3.2.4 <i>Hitzeschockproteine in der Onkologie</i>	40
1.3.3 Hyperthermie und das Proteasom	42
1.3.4 Klinische und technische Anwendung der Hyperthermie	44
1.3.5 Aktuelle Anwendung der Hyperthermie in der Onkologie	45
2 Ziel der Untersuchungen	48
2.1 Das Model	49
2.2 Aufbau der Studie	50
3 Material und Methoden	53
3.1 Chemikalien	53
3.2 Materialien	54
3.2.1 Laborausstattung	54
3.2.2 Mantelzelllymphomzelllinien	55
3.2.3 Materialien zur Zellkultur	56
3.2.3.1 <i>Zellkulturmedien</i>	56
3.2.3.2 <i>Gefäße zur Zellkultur und Plastikware</i>	56
3.2.3.3 <i>Materialien zur Bestimmung der Zellviabilität</i>	56
3.2.3.4 <i>Materialien zur Hitzeschockanwendung</i>	56

3.2.4	Biochemische Materialien	57
3.2.4.1	<i>Puffer und Antikörper zum Westernblot</i>	57
3.2.4.1.1	Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	57
3.2.4.1.2	Puffer zur Zelllyse und Lösung zum Westernblot	58
3.2.4.1.3	Antikörper zum Westernblot	60
3.2.5	Materialien zur Bortezomibbehandlung	61
3.3	Methoden	61
3.3.1	Techniken der Zellkultur	61
3.3.1.1	<i>Zellkultur der Mantelzelllymphomzelllinien</i>	61
3.3.1.2	<i>Einfrieren und Auftauen der Zellen</i>	61
3.3.1.3	<i>Bestimmung der Zellviabilität mittels Trypanblau- Ausschlusstest</i>	62
3.3.2	Behandlung der Zellen mit Bortezomib und Auswertung mittels WST-1-Zellproliferationsassay	63
3.3.3	Hitzeschockbehandlung	66
3.3.4	Gleichzeitige Anwendung von Hyperthermie und Bortezomib	66
3.3.5	Biochemische Analyse der Proteinexpression	67
3.3.5.1	<i>Zelllyse</i>	67
3.3.5.2	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)</i>	67
3.3.5.3	<i>Westernblot Analyse</i>	67
4	Ergebnisse	69
4.1	Dosis-abhängige unterschiedliche Sensitivität der Mantelzelllymphomzelllinien gegenüber Bortezomib	69
4.2	Effekte der Hyperthermie auf die Zellviabilität und das Überleben der Mantelzelllymphomzelllinien in Abhängigkeit der thermalen Dosis	71

4.3 Konstitutive Expression und hitzeinduzierte Überexpression der Hitzeschockproteine in Mantelzelllymphomzelllinien	72
4.4 Vorbehandlung der Mantelzelllymphomzelllinien durch Hyperthermie und die dadurch induzierte Überexpression der Hitzeschockproteine interferiert nicht mit den Effekten von Bortezomib im Mantelzelllymphom und ist unabhängig von der Thermal dosis	75
4.5 Die gleichzeitige Applikation von Hyperthermie und Bortezomib zeigt einen additiven Effekt in Mantelzelllymphomzelllinien	80
5 Diskussion	83
6 Zusammenfassung	87
7 Literaturverzeichnis	89

Verzeichnis der Abbildungen

1. Einleitung

- Abbildung 1: aktuelle Therapieempfehlung außerhalb klinischer Studien 24
- Abbildung 2: Struktur des Proteasoms 26
- Abbildung 3: der Ubiquitin-Proteasom-Pathway 27
- Abbildung 4: chemische Struktur von Bortezomib 28
- Abbildung 5: Inhibition des Proteasoms durch Bortezomib 30
- Abbildung 6: Darstellung der temperaturabhängigen Vorgänge innerhalb
der Tumorzelle in Bezug auf das Zellüberleben 35
- Abbildung 7: Darstellung der Hitzeschockproteine am Beispiel von Hsp70 38

2. Ziel der Untersuchungen

- Abbildung 8: Darstellung des Versuchsaufbaus 52

3. Material und Methoden

- Abbildung 9: Aufspaltung des WST-1 Tetrazoliumsalzes zu Formazan 64
- Abbildung 10: 96-well Platte zur Auswertung der Zellproliferation mittels
WST-1 Assay 65

4. Ergebnisse

- Abbildung 11: Gesamtüberleben der drei Zelllinien Jeko-1, Rec-1 und
NCEB-1 in Gegenwart ansteigender Konzentrationen von
Bortezomib 70
- Abbildung 12: Darstellung der Expression der Hitzeschockproteine
Hsp90, Hsp70, Hsc70 und Hsp27 anhand der Westernblot
Analyse 74
- Abbildung 13: Darstellung des Zellüberlebens als Prozentsatz proli-
ferierender Zellen nach Vorbehandlung mit Hyperther-
mie und anschließender Behandlung mit Bortezomib 77 – 79
- Abbildung 14: Darstellung des Zellüberlebens als Prozentsatz
proliferierender Zellen bei gleichzeitiger
Behandlung von Hyperthermie (44 °C/30 Minuten) und
Bortezomib oder Bortezomib allein bei 37°C 81 - 82

Verzeichnis der Tabellen

1. Einleitung

- Tabelle 1: Anwendung von Bortezomib in Phase II-Studien 32
- Tabelle 2: die Hitzeschockproteine und ihre Funktionen in gestressten Zellen 39
- Tabelle 3: die Rolle der Hitzeschockproteine hinsichtlich der Resistenz verschiedener Non-Hodgkin-Lymphome gegenüber Medikamenten 41
- Tabelle 4: Übersicht über den Einfluss von Hyperthermie auf das Proteasom 43
- Tabelle 5: Übersicht über ausgewählte Medikamente, die eine Interaktion bei Kombination mit Hyperthermie zeigen 47

3. Material und Methoden

- Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Mantelzelllymphomzelllinien und ihrer Eigenschaften 55
- Tabelle 7: Vorlage zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele 57
- Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Antikörper zur Durchführung des Westernblots 60

4. Ergebnisse

- Tabelle 9: IC_{50} -Werte der jeweiligen Zelllinie nach 24 Stunden der Inkubation mit ansteigenden Bortezomib-Konzentrationen 70
- Tabelle 10: Überlebensraten von Jeko-1, Rec-1 und NCEB-1 nach Hitzeschockbehandlung 72
- Tabelle 11: Vergleich der IC_{50} -Werte bei gleichzeitiger oder gefolgter Anwendung von Hyperthermie und Bortezomib in Abhängigkeit der Temperatur 76

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Akt	Proteinkinase B
ARF	alternative reading frame
ASCT	autologous stem cell transplantation
ATM	ataxia telangiectasia mutated
Bcl	B-cell lymphoma
BRCA	breastcancer
c-Abl	cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
CD	cluster of differentiation
CDK	cyclin dependent kinase
Chk	checkpoint kinase
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CR	complete response
CRR	complete response rate
CVAD	Cyclophosphamid, Adriamycin, Vincristin, Dexamethason
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DOR	duration of response
ECL	enhanced chemiluminescence
FBS	fetal bovine serum
FCM	Fludarabin, Cyclophosphamid, Mitoxantron
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FMC	Flinders-Medical-Center
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
Hsc	heat shock cognate protein
Hsf	Hitzeschockfaktor
Hsp	Hitzeschockprotein

I	Iod
ICAM	inter-cellular adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
IkB	inhibitor kB
IL	Interleukin
ink	inhibitor of kinase
kD	kilo-Dalton
Ki	inhibitorische Konstante
KP	Kern-Partikel
l	Liter
MCL	mantle cell lymphoma
Mdm2	murine double minute-2
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Nbs	Nijmegen-breakage-Syndrom
NF-kB	nuclear factor kB
NHL	non-Hodgkin Lymphom
nM	Nanomol
OD	optische Dichte
ORR	overall response rate
OS	overall survival
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDK	phosphoinositide-dependent kinase
PFS	progression free survival
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphat
pRb	Retinoblastomprotein
R	Rituximab
REAL	Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms
RNA	ribonucleic acid

RP	Regulator-Partikel
RPMI	Rosewell-Park-Memorial-Institute
RR	response rate
SBD	Substratbindungsdomäne
SDS	Sodiumdodecylsulfate
TBS	tris buffered saline
TCA	trichloroacetic acid
TEMED	Tetramethylethylendiamine
TTF	time to treatment failure
TTP	time to progression
Ub	Ubiquitin
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	world health organisation
WST	water soluble tetrazolium
Y	Yttrium

1 Einleitung

1.1 Das Mantelzelllymphom

1.1.1 Klassifikation und klinische Manifestation

Das Mantelzelllymphom ist ein Subtyp der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und wurde das erste Mal 1970 beschrieben. Zunächst wurde das Mantelzelllymphom in der europäischen Literatur als zentrozytisches Lymphom (Kiel Klassifikation) oder im amerikanischen Sprachraum auch als lymphozytisches Lymphom mittleren Differenzierungsgrades oder als intermediäres lymphozytisches Lymphom und letztlich als Mantelzonenlymphom beschrieben, bis diese Gruppe von Erkrankungen schließlich einheitlich unter dem Begriff Mantelzelllymphom durch die revidierte europäisch-amerikanische Klassifikation der lymphoiden Neoplasien (REAL) und der WHO-Tumor-Klassifikation weltweit definiert wurde ^[1].

Etwa 5-10% aller NHL entfallen auf das Mantelzelllymphom; mit einer Neuerkrankungsrate von 2-3/100000 Einwohner wird das Mantelzelllymphom hauptsächlich bei Männern des mittleren Lebensalters (65-75 Jahre) diagnostiziert. Zum Zeitpunkt der Diagnose liegt meist ein weit fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung vor ^[2].

Die klinischen Manifestationen reichen von generalisierter Lymphadenopathie und Hepatosplenomegalie bis hin zu Knochenmarksinfiltration und Befall des gastrointestinalen Systems. Auch eine leukämische Ausschwemmung im peripheren Blut liegt häufig vor (26%) ^[3-5].

Das Mantelzelllymphom stellt eine sehr aggressive Form der Lymphome dar, weshalb sich die therapeutischen Optionen schwierig gestalten.

Die mittlere Überlebenszeit beläuft sich auf drei bis vier Jahre ^[3], da es nach initialer Chemotherapie regelhaft zu einem Fortschreiten der Erkrankung kommt oder bereits von Anfang an eine Resistenz gegenüber einer medikamentösen Therapie besteht.

1.1.2 Morphologie, Phänotyp und Pathogenese

Kennzeichnend für das Mantelzelllymphom sind kleine bis mittlere lymphoide Zellen, welche die Mantelzone des Lymphknotens infiltrieren. Hierbei zeigen sich noduläre oder diffuse Wachstumsmuster, die die Architektur des Lymphknotens meist weitgehendst zerstören.

Die Tumorzellen selbst gleichen dem ausgereiften B-Zell-Immunphänotyp mit Oberflächenexpression der Immunglobuline IgM und IgD, λ -Leichtketten und der Koexpression des T-Zell-assoziierten Antigens CD5. Charakteristisch ist auch die Expression von CD20, CD43 und FMC7, jedoch zeigen sie keine Expression für CD23 und den Follikelzentrumsmarker CD10 und bcl-6.

Darüber hinaus gibt es phänotypische Varianten, welche eine Negativität für CD5 oder Positivität für CD10, bcl-6, CD7 oder CD8 aufweisen ^[3, 4].

Beim Mantelzelllymphom lassen sich zytologisch zwei Hauptvarianten unterscheiden: neben dem typischen oder klassischen Typ existiert auch eine blastoide Form.

Der typische oder klassische Typ ist durch irreguläre Kerne und unauffällige Nukleoli in proliferierenden kleinen bis mittleren zytoplasmaarmen Zellen charakterisiert, welche manchmal auch Ähnlichkeit mit Zellen der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) zeigen.

Der weitaus aggressivere blastoide Subtyp hingegen zeigt eine blastische Morphologie mit mittleren bis großen pleomorphen Zellen und rundem oder irregulärem Kern, welche wiederum an Lymphoblasten oder großzellige Lymphome erinnern. ^[6]

Die blastoide Erkrankungsvariante ist gekennzeichnet durch eine hohe Mitoserate, komplexen Karyotypen und unterschiedlichen Genmutationen/-deletionen (p53, p16INK4a).^[7]

Trotz dieser zytologischen Differenzierung kann die Unterscheidung zu anderen B-Zell-Lymphomen in beiden Fällen schwierig sein, da manche Tumore durchaus überlappende morphologische Kriterien zeigen. In diesem Sinne müssen diese beiden Subtypen wohl eher als Grenzen eines weiten morphologischen Spektrums betrachtet werden. ^[3, 8]

Das entscheidende Charakteristikum des Mantelzelllymphoms ist die Translokation t(11;14)(q13;q32) im Genom der Lymphom-Zelle. Diese Translokation zeigt sich in etwa 50-80% der Mantelzelllymphom-Fälle und führt zu einer Überexpression des Cyclin D1 Proteins. Das Cyclin D1 Protein ist an der malignen Transformation der Lymphomzelle durch Dysregulation der normalen Kontrolle des Zellzyklus in der G1-S-Phase beteiligt.

Obwohl die Cyclin D1-Überexpression in fast allen Fällen des Mantelzelllymphoms gefunden wird, ist sie dafür nicht spezifisch, da sie auch in wenigen anderen lymphoproliferativen Erkrankungen vorhanden ist. Da die Überexpression jedoch nicht in normalen B-Zellen vorkommt, muss bei Anwesenheit einer erhöhten Menge von Cyclin D1-Protein von einem malignen Prozess ausgegangen werden ^[1, 9-12].

Neben dieser charakteristischen Genomaberration gibt es auch verschiedene Subvarianten des Mantelzelllymphoms, welche noch weitere genetische Alterationen oder Aberrationen zeigen, wie beispielsweise ARF/Mdm2/p53, p16ink4a/CDK4 oder das ATM-Gen ^[3].

Wie bereits beschrieben, führt die chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32) zu einer Überexpression von Cyclin D1. Im Detail kommt es hierbei zu einer Kopplung des BCL-1 (B-cell lymphoma/leukaemie)-Gens von Chromosom 11 an den Promoter der schweren Immunglobulinrezeptorkette (IgH-Gen) auf Chromosom 14. In dieser Region liegt auch das für Cyclin D1 kodierende Gen CCDN1, welches hierdurch unter die Kontrolle des IgH-Promoters kommt und folglich in einer Überexpression von Cyclin D1 resultiert ^[6].

Cyclin D1 spielt eine Schlüsselrolle in der Zellzyklus-Regulation, indem es den Übergang der G1- in die S-Phase zusammen mit den cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) -4 und -6 durch Phosphorylierung des Retinoblastom Proteins (pRb) kontrolliert.

Die übermäßige Expression von Cyclin D1 führt zu einem beschleunigten Übergang von der G1- in die S-Phase und begünstigt somit das Tumorwachstum.

Auch wenn die erwähnte Translokation mit resultierender Überexpression von Cyclin D1 ein genetisches Charakteristikum des Mantelzelllymphoms ist, wurden bereits wenige Fälle (<10%) entdeckt, welche keine Überexpression zeigen. Dies weist darauf hin, dass diese Fälle die Translokation nicht besitzen. Da diese Cyclin-D1-negativen Erkrankungen jedoch ein ähnliches klinisches Verhalten wie positive Erkrankungsfälle zeigen, vermutet man, dass dies auf eine kompensatorische Erhöhung von Cyclin D2 oder Cyclin D3 zurückzuführen ist ^[13].

Neben diesem genetischen Kennzeichen des Mantelzelllymphoms finden sich noch weitere Chromosomenalterationen, welche regelmäßig bei dieser Lymphomart auftreten. Die meisten dieser Genveränderungen können mittels der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) detektiert werden.

Beispielsweise konnte in 40-75% eine fehlende Region im Genom des Mantelzelllymphoms erkannt werden (11q22-23), welche normalerweise das ataxia telangiectasia mutated (ATM)

Gen beinhaltet. ATM ist unter anderem im Zusammenhang mit der Erkrankung Ataxia telangiectasia bekannt, bei der es durch Mutationen im Bereich des ATM-Gens zu entsprechender Pathologie kommt.

ATM kodiert eine Phosphoproteinkinase der Phosphatidylinositol-3-kinase-Familie. Dieses Enzym spielt eine zentrale Rolle in der zellulären Antwort auf einen DNA-Schaden bezüglich DNA-Reparatur, Rekombination und Zellzykluskontrolle, indem es verschiedene Schlüsselproteine wie p53, Mdm2, Chk1, Chk2, BRCA1, c-Abl oder Nbs1 aktiviert. ATM wird in diesem Rahmen auch als Tumorsuppressorgen diskutiert. Der Funktionsverlust des ATM-Gens korreliert des Weiteren mit zahlreichen Chromosomeninstabilitäten und – imbalanzen, jedoch findet sich kein Zusammenhang mit der klinischen Verlaufsform des Mantelzelllymphoms ^[6, 14-16].

Eine weitere Auffälligkeit zeigt sich bezüglich des Tumorsuppressorgens p53. Die Inaktivierung korreliert mit der Pathogenese von besonders aggressiven Formen lymphoproliferativer Erkrankungen, das Mantelzelllymphom eingeschlossen.

p53 führt bei DNA-Schäden und anderen Arten von zellulärem Stress zur Unterbrechung der normalen Zellproliferation bis hin zur Apoptose. Während eine Inaktivierung von p53 kaum in der klassischen Variante des Mantelzelllymphoms gefunden wird, zeigt es sich in nahezu 30% der blastoiden Form und ist mit einer schlechten Prognose der Erkrankung verbunden ^[6]. Eine ebenfalls entscheidende pathologische Veränderung im Mantelzelllymphom betrifft den Transkriptionsfaktor NF- κ B. NF- κ B befindet sich in inaktivierter Form, durch Bindung an seinen Inhibitor I κ B α , im Zytoplasma der Zelle und wird im Rahmen von zellulären Immun- oder Entzündungsereignissen durch Loslösung von I κ B α aktiviert. Hierdurch kommt es zur Transkription entsprechender Proteine, die zur Regulierung von Zellwachstum und Überleben beitragen.

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass beim Mantelzelllymphom eine konstitutive Expression von aktiviertem NF- κ B vorliegt, was zur Entwicklung des gestörten Zellzyklus entscheidend beiträgt.

Diese Erkenntnis ist Bestandteil zahlreicher aktueller Studien, in denen neue Therapieansätze für das Mantelzelllymphom untersucht werden ^[17].

Neueren Studien zufolge findet sich auch im Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg eine pathologische Veränderung im Mantelzelllymphom.

Dieser Signaltransduktionsweg ist in die Reaktion der Zelle auf extrazelluläre Stimuli eingebunden, welche zu Zellproliferation, Zellwachstum, Apoptose und Überleben beitragen. Die Rolle von PI3K besteht darin, als Verstärker zahlreicher Oberflächenrezeptoren zu dienen, indem es die zelluläre Konzentration von Phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphat (PIP3) aus Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat (PIP2) anhebt und durch Bindung an Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK1) und an Serin/Threonin-Kinase Akt zur Translokation dieser Proteine durch die Zellmembran sowie deren anschließende Aktivierung führt.

Aktiviertes Akt hat zahlreiche Zielproteine (proapoptotisches Protein Bad, CDK-Inhibitor p27^{kip1}, mTOR), wodurch es folglich zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen sowie Verhinderung der Apoptose kommt.

Rudelius *et al.* zeigten in einer Studie, dass der PI3K/Akt-Pfad in der aggressiven blastoiden Form des Mantelzelllymphoms konstitutiv aktiviert ist und auch in einem geringen Anteil des klassischen Typs vorkommt ^[18, 19].

1.1.3 Aktuelle Therapiestandards des Mantelzelllymphoms

Der klinische Verlauf nach Diagnose eines Mantelzelllymphoms ist durch die Aggressivität und rasche Progredienz der Erkrankung gekennzeichnet und daher auf drei bis vier Jahre begrenzt. Daher wird versucht, die bestehenden Therapiekonzepte fortlaufend zu optimieren. Zu den aktuell angewandten Verfahren zählen sowohl der Einsatz eines einzigen Medikaments als auch die Kombination mehrerer unterschiedlicher Wirkstoffe inklusive Radiotherapie und Stammzelltransplantation (Abbildung 1).

1.1.3.1 Chemotherapie und die Anwendung von Rituximab

Als Induktionstherapie kommt meist eine konventionelle Chemotherapie in Kombination mit Rituximab zur Anwendung.

Bezüglich der Chemotherapie-Schemata gibt es drei große Kategorien:

neben Doxorubicin-haltigen Therapieformen wie z. B. R-CHOP/CHOP (Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison) kommen auch intensiviertere

Verfahren wie R-HyperCVAD (Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Dexamethason, ggf. in Kombination mit Cytarabin und Methotrexat) sowie purinanaloga-haltige Regime wie R-FCM (Rituximab, Fludarabin, Cyclophosphamid, Mitoxantron) zur Anwendung. Die Ansprechraten aller drei Kategorien liegen zwischen 80 und 95% ^[20, 21]. Als Standardtherapie gilt zunächst das CHOP-Regime, im Rezidiv bei bereits CHOP-vorbehandelten, älteren Patienten, welche sich nicht für eine Hochdosistherapie qualifizieren, wird ein purinanaloga-haltiges Schema empfohlen ^[22].

In neueren Untersuchungen werden auch Bendamustin-haltige Schemata diskutiert, die aufgrund ihrer guten Verträglichkeit zunehmend an Bedeutung gewinnen ^[22].

Die Kombination der erwähnten Therapieformen mit Rituximab, einem anti-CD20-Antikörper, zählt wohl zu den bisher bestuntersuchten Anwendungsformen im Bereich des Mantelzelllymphoms, auch wenn die Anwendung noch nicht so gut untersucht wurde wie bei anderen Lymphomerkrankungen.

Die Monotherapie des Antikörpers wurde in verschiedenen Studien untersucht. Hierbei zeigte sich zwar eine Aktivität bei Behandlung des Mantelzelllymphoms, jedoch mit einer nur geringen Wirkung (Ansprechraten 20-40%) ^[20]. In Kombination mit CHOP zeigen sich allerdings beachtliche Ergebnisse.

Die German Low Grade Lymphoma Study Group untersuchte den Effekt der Hinzunahme von Rituximab zur CHOP-Therapie versus der alleinigen initialen Therapie mit CHOP. Hierbei zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der R-CHOP-Therapie in Bezug auf die „overall response rate“ (ORR) (94 versus 75%), die „complete response rate“ (CRR) (34% versus 7%) und die „time to treatment failure“ (TTF) (21 versus 14 Monate). Jedoch war die Behandlung nach diesem Therapiekonzept nicht hinsichtlich des „progression free survival“ (PFS) und dem „overall survival“ (OS) überlegen. Der Großteil der Patienten erlag einem Rezidiv innerhalb von 2 Jahren ^[23].

In diesem Zusammenhang kann die Gabe von R-CHOP zwar als deutlicher Fortschritt gegenüber der alleinigen CHOP-Therapie gesehen, als kurativer Therapieansatz jedoch noch nicht betrachtet werden ^[21, 23, 24].

Ein anderer Therapieansatz besteht in der Anwendung von Purin-Nukleosid-Analoga, wie beispielsweise Fludarabin. Diese kommen als Einzeltherapeutikum oder zum Beispiel in Kombination mit Cyclophosphamid und Mitoxantron zum Einsatz. Als Einzeltherapeutikum konnten Ansprechraten von 33% bis 41% erhoben werden und beachtlicherweise von 63%, wenn Fludarabin mit Cyclophosphamid kombiniert wird ^[21].

Forstpointner *et al.* untersuchte 2006 die Auswirkungen der Hinzunahme von Rituximab als Additionsfaktor zum FCM-Chemoregime bei Patienten mit rückfälligem Mantelzelllymphom oder follikulärem Lymphom. Die ORR der Mantelzelllymphom-Patienten konnte hierunter von 46% auf 58% gesteigert werden. Darüber hinaus konnte durch eine Erhaltungstherapie mit Rituximab nach erfolgter Chemotherapie bei chemosensitiven Patienten ebenso ein Benefit erzielt werden. Im Vergleich zu Patienten, die keine Erhaltungstherapie mit Rituximab erhielten, konnte bei den Patienten mit Rituximab ein deutlich höherer Anteil an Remissionen über zwei Jahre verzeichnet werden (45% versus 9%) [25].

Zusammenfassend erscheint die Addition von Rituximab auch in Anbetracht der geringen Nebenwirkungen als durchaus sinnvoll. Auch scheint die Erhaltungstherapie mit Rituximab effektiv zu sein. Dennoch sind hier weitere Studien notwendig, um vor allem die mediane Nachbeobachtungszeit zu verlängern und somit das Gesamtüberleben der Patienten zu beurteilen.

1.1.3.2 Bestrahlung

Die Bestrahlung als kurativer Therapieansatz steht aktuell nur bei Ann-Arbor Stadien 1 und 2 zur Diskussion. In den Stadien 3 und 4 ist die Kombination der Bestrahlung zur Chemotherapie nicht gesichert und sollte nur bei großen residuellen Lymphommassen diskutiert werden. Eine lokale Bestrahlungsbehandlung kommt demnach nur bei Patienten mit limitierter Krankheitsausdehnung zur Anwendung, die auf konventionelle Therapieformen nicht ansprechen [26].

1.1.3.3 Radioimmuntherapie

Auch im Bereich der Radioimmuntherapie wurden bereits Untersuchungen durchgeführt, um die Therapieoptionen des Mantelzelllymphoms zu verbessern. Hierbei kommen anti-CD20-Radioimmunkonjugate, ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan (Zevalin) und ^{131}I -tositumomab (Bexxar) zur Anwendung.

In einer Studie des M.D. Anderson Cancer Centers wurde ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan als Monotherapie in refraktären oder rückfälligen Mantelzelllymphom-Fällen eingesetzt. Hierbei kam es zu einer Gesamtansprechrate von 42%, wobei acht (26%) komplette Remissionen und

fünf partielle Remissionen (16%) erzielt werden konnten, jedoch lag das progressionsfreie mittlere Überleben lediglich bei sechs Monaten. Nicht zu vernachlässigen ist jedoch die gute Verträglichkeit der Substanz, deren Nebenwirkungen sich vorwiegend im hämatologischen Bereich ansiedeln.

Eine weitere Studie der European MCL Network und der Polish Lymphoma Research Group untersuchte die Gabe von ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan als initiale Therapie oder als Konsolidierung im Anschluss an eine Zytoreduktion, was einen Vorteil der Konsolidierungstherapie vermuten lässt und sich auch in weiteren Studien als sicher und effektiv erwies.

Auch ¹³¹I-tositumomab wurde bereits mehrfach untersucht, wobei hier die Kombination aus Chemotherapie und myeloablativer Radioimmuntherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation eine entscheidende Rolle spielte. Das 3-Jahres-Gesamtüberleben lag in diesem Fall bei 93%, das progressionsfreie Überleben bei 61%. Um jedoch diese Form der Therapiekombination bewerten zu können, sind noch weitere Untersuchungen von Nöten ^[20].

1.1.3.4 Autologe und allogene Stammzelltransplantation

Da die Erfolge im Bereich der Chemotherapie nach wie vor sehr begrenzt sind und kein kuratives Therapiekonzept vorliegt, wurde auch die Stammzelltransplantation bei der Behandlung des Mantelzelllymphoms intensiv untersucht.

In einer Studie des „European MCL Network“ wurde die Wirksamkeit einer myeloablativen Konsolidierungs-Radiochemotherapie gefolgt von autologer Stammzelltransplantation (ASCT) versus einer Erhaltung mit Interferon während der ersten Remission erhoben. Die 122 Patienten waren maximal 65 Jahre alt und zeigten ein fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung. Die Induktionstherapie bestand aus einem CHOP-Regime, um eine komplette oder partielle Remission zu erzielen.

Mit dieser Studie konnte letztlich ein deutlicher Vorteil der Behandlung mit autologer Stammzelltransplantation gegenüber der Interferon-Therapie gezeigt werden. Die transplantierten Patienten profitierten hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens mit 39 Monaten gegenüber den Patienten des Interferon-Arms mit 17 Monaten. Das 3-Jahres-Gesamtüberleben lag bei 83% (ASCT) versus 77% ^[27].

Einen entscheidenden Prognosefaktor der Effektivität der autologen Stammzelltransplantation stellt der Zeitpunkt der Transplantation dar. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten, die während einer kompletten Remission transplantiert werden, mehr von der Transplantation profitieren als Patienten, welche erst nach einem Rückfall transplantiert werden. Unter den 195 Patienten zeigten jene, welche zwar eine chemosensitive Erkrankung hatten, sich jedoch nicht mehr in der ersten kompletten Remission befanden, ein 2,99 mal höhere Sterberate, als diejenigen, die in der ersten kompletten Remission transplantiert wurden^[28].

Die allogene Transplantation hingegen wird aktuell als einziger potenziell kurativer Therapieansatz diskutiert, selbst bei Patienten mit refraktärem oder rückfälligem Erkrankungsstadium^[26]. Aufgrund des hohen Erkrankungsalters der meisten Patienten ist eine konventionelle allogene Transplantation mit vorheriger myeloablativer Therapie jedoch kaum durchführbar. In neueren Studien konnten mit nicht-myeloablativen Therapieformen beachtliche Ergebnisse erzielt werden. Khouri *et al.*^[29] untersuchte bei 18 Patienten mit weit fortgeschrittenem oder rückfälligem Mantelzelllymphom die allogene Stammzelltransplantation und erhob am Ende ein progressionsfreies Überleben nach drei Jahren von 82%. Der Nachteil dieser Studien liegt jedoch darin, dass sie zum einen sehr klein sind und die erhobenen, vielversprechenden Daten durch parallele Studien widerlegt werden^[30]. Um die Effektivität der nicht-myeloablativen Stammzelltransplantation bewerten zu können, müssen noch weitere Studien durchgeführt werden.

1.1.3.5 Neue Therapieansätze des Mantelzelllymphoms

Von besonderem Interesse ist die Behandlung des Rückfalls des Mantelzelllymphoms. Hierbei stehen drei Gruppen von neuen Substanzen im Vordergrund: Proteasomeninhibitoren, auf die im weiteren Verlauf näher eingegangen wird, mammalian target of rapamycin (mTOR)-Inhibitoren und Thalidomid.

Thalidomid als Angiogenesehemmer kam bisher besonders bei der Therapie des multiplen Myeloms zum Einsatz. Thalidomid wurde in einer Studie in Kombination mit Rituximab bei Patienten mit Mantelzelllymphom untersucht, bei der das mittlere PFS bei 20,4 Monaten lag, und ein 3-Jahresüberleben von 75% zeigte^[31]. Thalidomid in Kombination mit Rituximab

stellt besonders bei älteren Patienten mit refraktärem oder rückfälligem Erkrankungsstadium eine therapeutische Option dar ^[4].

Ein ebenfalls neuer Ansatz wird in der Anwendung von mTOR-Inhibitoren gesehen. Die mTOR-Kinase reguliert die mRNA Translation von Cyclin-D1-mRNA zu Cyclin D1-Protein durch Phosphorylierung zweier wichtiger Substrate, den eukaryotischen Aktivierungsfaktor 4E und die p70S6-Kinase. Da mTOR, wie bereits oben beschrieben, im PI3K/Akt-Pfad ein Zielprotein darstellt, bietet dieser Therapieansatz besonders für die blastoide Form des Mantelzelllymphoms neue Perspektiven. Inhibitoren dieser Kinase sind beispielsweise Rapamycin-Analoga (Temsirolimus), was zu Apoptose und Inhibierung der Angiogenese führt ^[4].

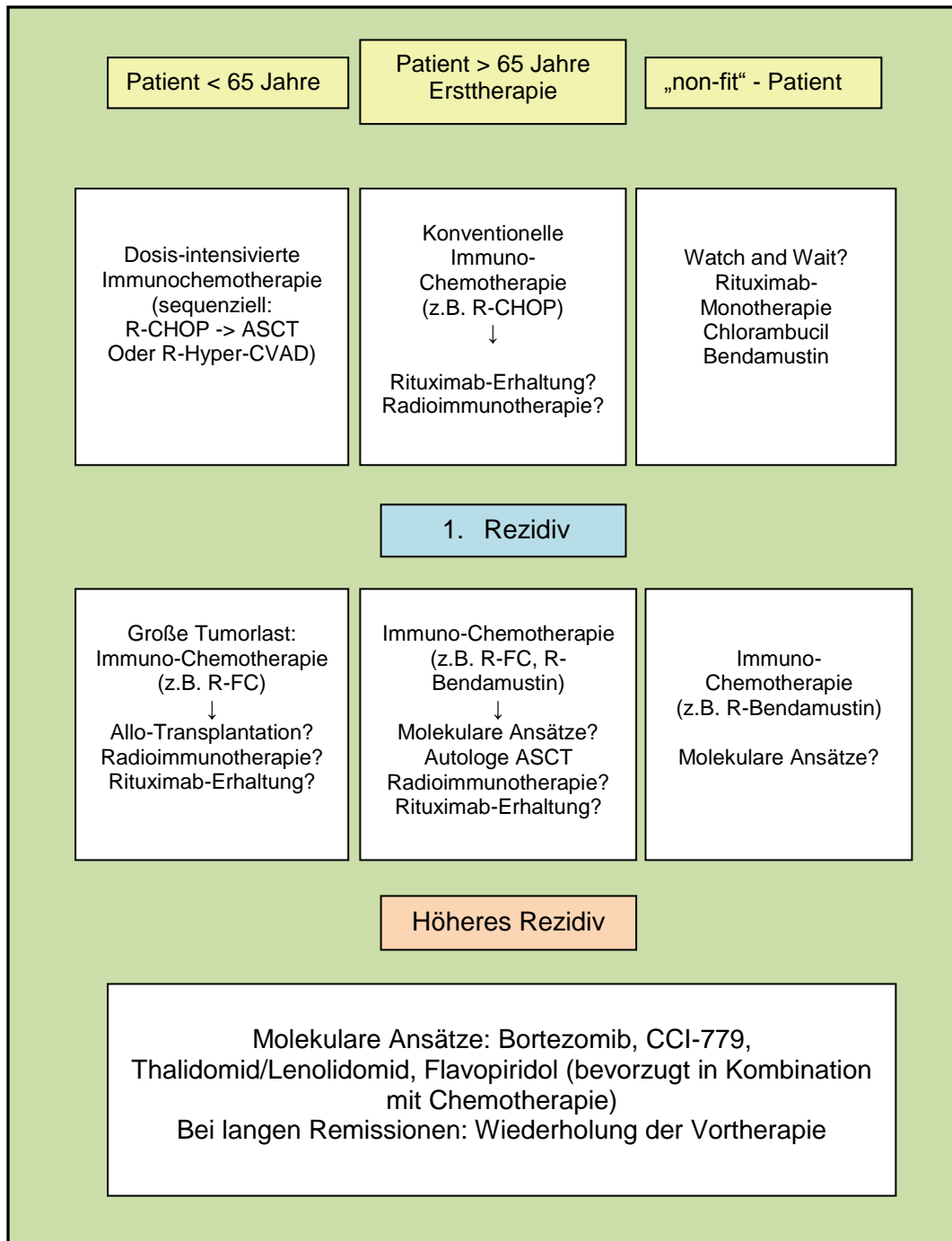


Abbildung 1: aktuelle Therapieempfehlungen außerhalb klinischer Studien.

(aus Manual Maligne Lymphome des Tumorzentrums München und W. Zuckschwerdt Verlag München, 2008)^[32]

1.2 Bortezomib

1.2.1 Das Proteasom – Struktur und Funktionsweise

Das 26S-Proteasom ist ein wichtiger Enzymkomplex, der für die Regulierung des intrazellulären Protein-Gleichgewichts in Eukaryonten verantwortlich ist, indem es als ATP-abhängige multikatalytische Protease agiert.

Mit einem Gewicht von etwa 1500-2000 kD befindet es sich im Zytosol und im Kern der Zelle und ist aus zwei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut, der 20S- und 19S-Untereinheiten^[33].

Der sogenannte 20S Kern-Partikel (KP) mit ca. 700 kD besteht aus insgesamt vier Ringen, die aufeinander gesetzt einen Zylinder formen. In diesem Zylinder findet die Proteolyse der Proteine statt. Die zwei inneren Ringe sind aus sieben β -Untereinheiten aufgebaut und besitzen katalytische Bereiche (β 1- β 7), wovon β 1, β 2 und β 5 jeweils die Funktion einer Protease haben und nach Enzymen mit ähnlicher proteolytischer Aktivität oder Spezifität als Chymotrypsin-, Trypsin- und Postglutamyl-ähnlich bezeichnet werden.

An jedem Ende dieser beiden aufeinander gesetzten β -Ringe bildet je ein α -Ring, bestehend aus wiederum sieben α -Untereinheiten, eine Eintritts- und Austrittspforte für Proteine in das katalytische Zentrum des Proteasoms.

Der 19S thermosensitive Regulator-Partikel (RP) ist unabkömmlich für die proteolytische Aktivität des Proteasoms. Er sitzt wie ein Deckel auf jedem der beiden α -Ringe und vervollständigt somit das Proteasom.

Der RP kann in zwei verschiedene Anteile untergliedert werden, eine Basis und ein Lid, welche zusammen insgesamt sechs ATPasen zur Energiegewinnung beinhalten. Diese Energie wird folglich zur Erkennung der ubiquitinierten Proteine und zu deren Vorbereitung und Linearisierung zum Eintritt in den KP verwendet, indem sie entfaltet und von ihrem Ubiquitin-Anteil befreit werden^[34-37] (Abbildung 2).

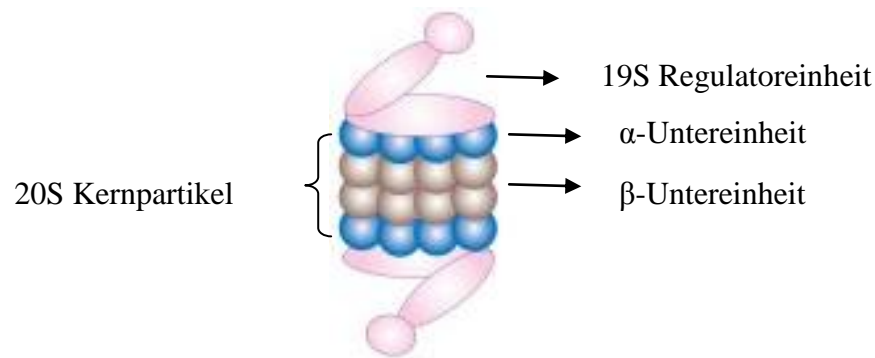


Abbildung 2: Struktur des Proteasoms

Das Proteasom besteht aus einem 20S Kern-Partikel und einem 19S Regulator-Partikel. Der 20S Kern-Partikel besteht aus vier Ringen mit zwei α - und zwei β -Untereinheiten, die von der 19S Einheit an jedem Ende umschlossen werden. (nach Boccadoro, 2005) ^[38]

Das 26S-Proteasom bildet den Mittelpunkt des Ubiquitin-Proteasomen-Pfads, welcher letztlich den intrazellulären Protein-Umsatz in allen eukaryotischen Zellen reguliert. Durch den Abbau verschiedenster Proteine, wie beispielsweise Zellzyklus-Regulationsproteine, Transkriptionsfaktoren, Schlüsselproteine wie auch kurzlebige Proteine (Cycline, p53, c-myc, I κ B, p27 und andere) ^[33] und beschädigte oder falsch-gefaltete Proteine, steuert das Proteasom den Fortschritt des Zellzyklus, das Überleben der Zelle und die Mitose.

Um die entscheidenden Proteine, die für den Abbau bestimmt sind, zu erkennen, werden diese zuvor mit einem Ubiquitin(Ub)-Rest mit C-terminalen Glycinresten an Lysinanteile gekoppelt.

Die Ubiquitinierung hängt von drei Enzymen ab, die mit dem Proteasom interagieren: das Ub-Aktivierungsenzym (E1), das Ub-Konjugationsenzym (E2) sowie die Ub-Ligase (E3). Diese Enzymkaskade findet in makromolekularen Komplexen statt ^[34].

Im Anschluss erkennt der 19S-RP das markierte Protein, entfernt den Ub-Anteil und das Protein wird durch die ATPase entfaltet, um in das katalytische Zentrum, den 20S-KP, einzutreten. Hier werden die Proteine nun durch die aktiven proteolytischen Seiten der β -Untereinheiten β 1, β 2, und β 5 hydrolysiert, um als kleine Peptide (im Schnitt von einer Länge von drei bis 22 Aminosäuren) das Proteasom zu verlassen ^[33, 34, 37] (Abbildung 3).

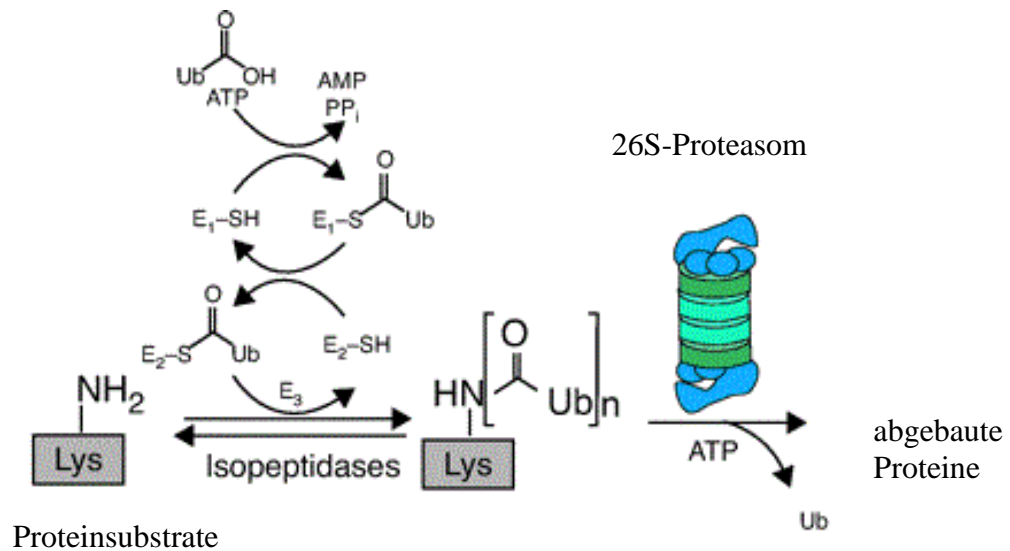


Abbildung 3: der Ubiquitin-Proteasom-Pathway.

Nachdem das Zielprotein erkannt wird, werden mit Hilfe der Enzyme E1, E2 und E3 Lysinreste im Protein ubiquitiniert. Im Folgenden entfaltet das Proteasom das Protein und die proteolytischen Seiten der β -Einheiten bauen das Protein zu kleinen Peptiden ab. (nach Adams, 2002)^[33]

Betrachtet man die entscheidende Rolle des 26S-Proteasoms hinsichtlich dem Zell-Überleben und dem Fortschreiten des Zellwachstums, ist das Proteasom als Ansatzpunkt neuer therapeutischer Optionen von wachsendem Interesse.

In den letzten Jahren wurde eine neue Klasse von Medikamenten, die sogenannten Proteasom-Inhibitoren, entwickelt, die in diesen multikatalytischen Prozess mit resultierendem Zelltod eingreifen.

1.2.2 Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib

Bortezomib, auch unter dem Namen Velcade oder früher als PS-341 bekannt, ist der erste Proteasom-Inhibitor, der Eintritt in die Klinik gefunden hat.

Bortezomib ist eine Borsäure mit niedrigem Molekulargewicht und einer wasserlöslichen Dipeptid-Struktur. Die inhibitorische Potenz des Medikaments (K_i) liegt bei etwa 0,6 nM^[39]. Etwa eine Stunde nach Injektion ist die Aktivität entfaltet, nach 48 Stunden ist die Wirkung abgeklungen^[40] (Abbildung 4).

Im Mai 2003 wurde Bortezomib durch die „US Food and Drug Administration“ und im April 2004 durch das „Committee for Proprietary Medicinal Products of the European Union“ für die Behandlung von rückfälligen oder refraktären Patienten mit multiplem Myelom anerkannt und zugelassen^[38-41].

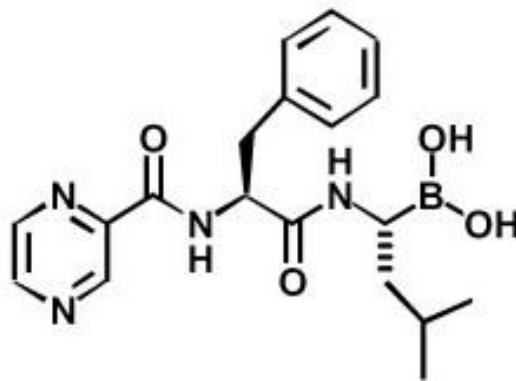


Abbildung 4: Chemische Struktur von Bortezomib. (nach Boccadoro, 2005)^[38]

1.2.3 Wirkungsweise von Bortezomib

Bortezomib zeichnet sich durch antitumoröse, antiproliferative, antiangiogenetische und proapoptotische Eigenschaften aus. Diese resultieren aus der hochselektiven und reversiblen Inhibition des 26S-Proteasoms, indem die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität der multimerischen Protease blockiert wird ^[39]. Hierdurch kommt es zur Dysregulation verschiedener Ereignisse innerhalb der Zelle, u.a. auch der Inhibition des Faktors NF-kB (Abbildung 5).

NF-kB ist im Zytosol der Zelle lokalisiert und durch seinen Inhibitor I-kB geblockt. Wird die Zelle einer Stresssituation ausgesetzt (Umweltstress, zytotoxische Agentien, Strahlung oder DNA-Schaden) ^[38, 39], reagiert sie durch Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, welche zum Abbau von I-kB durch das Proteasom führen. Wird die Bindung von I-kB an NF-kB durch dessen Abbau aufgehoben, kann NF-kB ungehindert in den Zellkern wandern und dort die Kodierung verschiedener Gene, deren Produkte mitunter für den Fortschritt des Zellzyklus und Zellwachstums verantwortlich sind, regulieren.

Unter die Kontrolle von NF-kB fallen auch Gene für Inflammationsreaktionen und Angiogenese (IL-6, IL-8 und VEGF) sowie für die Apoptoseinhibierung (Bcl-2, Bcl-xL). Auch Adhäsionsmoleküle wie E-selectin, ICAM-1 und VCAM-1 inklusive ihrer Rezeptoren, die in vivo an der Tumormetastasierung und -angiogenese beteiligt sind, werden durch NF-kB vermehrt exprimiert ^[13, 38, 39].

Generell kann man in Tumorzellen eine vermehrte Expression von NF-kB im Vergleich zu normalen Zellen finden ^[38]. Durch die Translokation von NF-kB und die folgende Genregulation kommt es zu einer dysregulierten Expression der Gene, was wiederum zu einem Ungleichgewicht der betroffenen Proteine in der Zelle führt.

Durch die Blockade des Proteasoms kann I-kB nicht mehr abgebaut werden, was zur Folge hat, dass NF-kB weiterhin inhibiert und die Gesamtaktivität reduziert wird. Eine Translokation in den Zellkern ist nicht mehr möglich und somit kommt es zu einem Mangel überlebenswichtiger Proteine der Zelle. Endpunkt dieser Kette ist die Apoptose.

Wie bereits oben schon erwähnt, werden hierdurch auch zahlreiche andere Zellmechanismen beeinträchtigt (Abbildung 5).

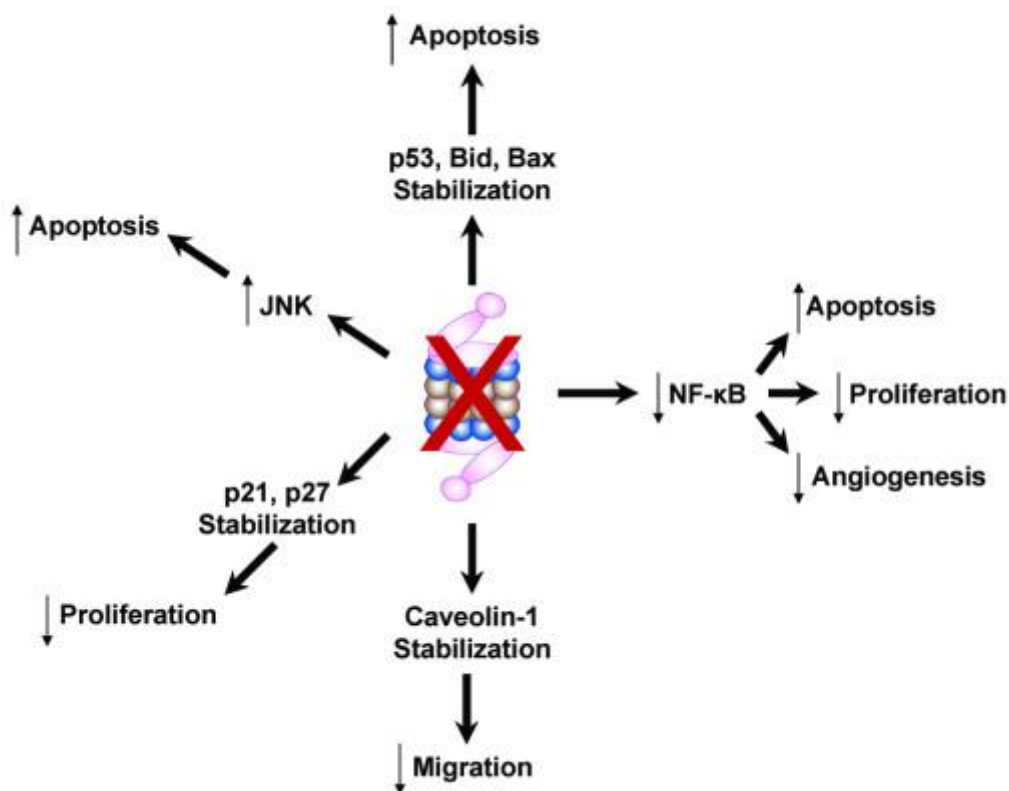


Abbildung 5: Inhibition des Proteasoms durch Bortezomib

Durch die Proteasomen-Inhibition durch Bortezomib werden zahlreiche Zellmechanismen beeinflusst. Neben Aktivierung der c-Jun-NH₂-Kinase kommt es zur Stabilisierung von p21 und p27, p53 sowie von Bid und Bax. (nach Boccardo, 2005)^[38]

Dazu zählt beispielsweise die Aktivierung von c-Jun-NH₂-Kinase, die eine entscheidende Rolle in der Reaktion der Zelle auf Stress oder falsch-gefaltete Proteine im Rahmen des Zelltods spielt.

Darüber hinaus führt Bortezomib durch Proteasomen-Inhibition zur Stabilisierung und Anreicherung der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21 und p27, des Tumorsuppressors p53 sowie der proapoptotischen Proteine Bid und Bax. Letztlich verhindert Bortezomib ebenso die Aktivierung von Caveolin-1. Caveolin-1 agiert im Bereich Zellmotilität und – Migration und muss vorab phosphoryliert werden, um seine vollständige Wirkung zu entfalten. Diese Phosphorylierung ist wiederum abhängig von VEGF. Da jedoch durch die Bortezomib-Blockade NF-κB nicht in den Zellkern wandert, wo es als Transkriptionsfaktor

die Expression von VEGF regulieren würde, kann die Phosphorylierung und dadurch bedingte Aktivierung von Caveolin-1 nicht stattfinden^[13, 38].

1.2.4 Klinische Anwendung von Bortezomib im Mantelzellymphom

Bortezomib hat durch seine oben beschriebene Wirkungsweise Einfluss auf eine Vielzahl von Mechanismen und wird damit zu einer vielversprechenden neuen Substanz in der Behandlung verschiedener bösartiger Erkrankungen. Im klinischen Bereich des Mantelzellymphoms kam es bereits in Phase I und Phase II Studien zum Einsatz, um neue Erkenntnisse bezüglich der Effektivität und Nebenwirkungen zu erhalten.

Fisher *et al.*^[42] erhob in einer Multizenter-Phase II Studie wegweisende Daten hinsichtlich des Einsatzes von Bortezomib in Patienten mit rückfälliger oder refraktärer Mantelzellymphom-Erkrankung. In dieser Studie wurde den Patienten eine Bortezomib-Dosis von $1,3 \text{ mg/m}^2$ an Tag 1, 4, 8 und 11 eines 21-tägigen Zyklus verabreicht. Unter 141 verwertbaren von insgesamt 150 Patienten wurde eine Ansprechrate von 33% erreicht. Hierunter waren 8% „complete responses“ (CR).

Die mittlere Dauer des Ansprechens lag bei 9,2 Monaten, wobei das Intervall bis zum Fortschreiten der Erkrankung bei 6,2 Monaten lag und das mittlere „overall survival“ (OS) nach 13,4 Monaten der Nachsorge noch nicht erreicht war. Nebenwirkungen von Bortezomib von Grad 3 und 4 umfasste Abgeschlagenheit (12%), periphere Neuropathie (13%) und Thrombozytopenie (11%).

Belch *et al.*^[43] untersuchte ebenfalls die Wirkung von Bortezomib in einer Phase-II Studie im Mantelzellymphom. Insgesamt 28 Patienten, von denen 13 Patienten zuvor noch keine Therapie erhielten, und 15 Patienten mit vorausgegangener Therapie, wurden in die Studie eingeschlossen. Die Behandlung verlief nach demselben Schema, wie in Fishers Studie beschrieben und ergab eine Ansprechquote von insgesamt 46,4 %. Hierbei ist erwähnenswert, dass sich kein Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen, vorbehandelt oder unbehandelt, abzeichnete. Die mittlere Dauer des Ansprechens lag bei 10 Monaten, jedoch wurde keine CR erreicht. Das mittlere Intervall bis zum Progress der Erkrankung lag bei 12,5 Monaten. Die durch Bortezomib ausgelösten Toxizitäten von Grad 3 oder 4 umfassten Abgeschlagenheit (31%), Neuropathie (10%), Myalgie und neuropathischen Schmerz (je 10%) sowie Thrombozytopenie (24%).

Vergleichbare Ergebnisse konnten in einer Studie von O'Connor *et al.* ^[44] erhoben werden, in der Bortezomib zur Behandlung des indolenten Non-Hodgkin-Lymphoms und Mantelzelllymphoms eingesetzt wurde (Tabelle 1).

Referenz	Anzahl der auswertbaren Patienten	RR	CR/CRu	DOR	TTP
Fisher <i>et al.</i> , 2006	141	33%	8%	9,2 Monate	6,2 Monate
Belch <i>et al.</i> , 2007	28	46,4%	0 (1 CRu)	10 Monate	12,5 Monate
O'Connor <i>et al.</i> , 2005	10	50%	10%	6-19 Monate	-

Tabelle 1: Anwendung von Bortezomib in Phase II-Studien.

RR: response rate; CR: complete response; DOR: duration of response; TTP: time to progression;
CRu: unconfirmed complete response.

In Zusammenschau dieser erhobenen Daten muss man Bortezomib einen doch beachtlichen Stellenwert in der Therapie des Mantelzelllymphoms zuschreiben.

1.3 Hyperthermie

1.3.1 Grundlagen und biologische Rationale der Hyperthermie

Während der letzten Jahre wurde die Hyperthermie mit einer kontrollierten Temperaturerhöhung von 40 °C – 44 °C im Bereich eines Tumors in ein multimodales Therapiesystem eingebunden, da beobachtet wurde, dass Hitze, abhängig von Zeit und Temperatur, durch direkte Zytotoxizität Zelltod verursachen kann und zudem zu einer Radio- und Chemosensitivierung führt. So wird durch Addition der Hyperthermie das Behandlungskonzept von Tumoren vervollständigt, um die lokale Tumorkontrolle zu verbessern und eine Verlängerung des rezidiv- bzw. metastasenfrenen Überlebens zu erzielen.

Die grundlegende zelluläre Beobachtung im Rahmen der Hyperthermie beruht auf der Auslösung eines zytotoxischen Effekts bei Temperaturerhöhung auf 42,5 °C – 45 °C, was folglich in der Auslösung der Nekrose oder Apoptose der Zelle resultiert.

Dieser zytotoxische Effekt steht in Abhängigkeit von der Temperatur und der Einwirkungsdauer, wodurch für die angewandte Temperaturerhöhung ein Dosis-Wirkungs-Prinzip aufgestellt werden kann, das für die unterschiedlichen Zellen jeweils graphisch darstellbar wird und deutlich zeigt, dass unterhalb dieses Temperaturbereichs („break-point temperature“) dieser direkt zytotoxische Effekt drastisch abnimmt. Unterhalb dieser „break-point temperature“ zeigen die Zellen jedoch einen weiteren Effekt, der sich mit dem Begriff der Thermotoleranz definieren lässt. Bei einer kontinuierlichen Temperatureinwirkung unter 42,5 °C werden die Zellen zunehmend resistent, das Phänomen ist jedoch reversibel und klingt 48-72 Stunden nach Beendigung der Hyperthermie-Anwendung ab.

Im Rahmen dieser Beobachtungen werden die zur Anwendung kommenden Thermal Dosen auch in sublethal (< 42,5 °C) und lethal (> 42,5 °C) untergliedert.

Auf molekularer Ebene lässt sich der zytotoxische Effekt der Temperaturerhöhung am ehesten dadurch erklären, dass die Energie zur Auslösung des Zelltods nahe an der Energie zur Denaturierung von Proteinen liegt. Dadurch kommt es intrazellulär zu Änderungen im Bereich von zytoplasmatischen, membranständigen und Kern-Proteinen sowie zu Beeinträchtigungen der Zellstabilität und möglichen Transportmechanismen.

Darüber hinaus induziert die Hyperthermie in vivo zusätzliche tumorselektive Effekte.

Da innerhalb des Tumors ein chaotisches, instabiles Gefäßsystem herrscht, kommt es zu hypoxischen und sauren Bereichen, die sensitiver gegenüber Hyperthermie als normale Gewebereiche sind. Im Bereich lethaler Temperaturen führt die Hyperthermie zusätzlich durch morphologische Veränderungen (endotheliale Schwellung, Plasmaverschiebungen, Mikrothrombosen u.a.) zu einer weiteren Verringerung der Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr im bereits vorherrschenden heterogenen Gewebe und folglich zum Zelltod.

Im Bereich sublethaler Temperaturen jedoch konnte ein deutlicher Anstieg der Blutversorgung und des Sauerstoffangebots innerhalb des Tumors beobachtet werden, wodurch die Zellen gegenüber Chemotherapeutika und Radiotherapie sensitiviert werden und die Hyperthermie damit als Kombinationstherapieform neue Bedeutung erlangte (Abbildung 6).

In zahlreichen Studien konnte bereits eine deutliche Verstärkung der Wirksamkeit einer Vielzahl von Medikamenten unter hyperthermen Bedingungen bewiesen werden ^[45-47].

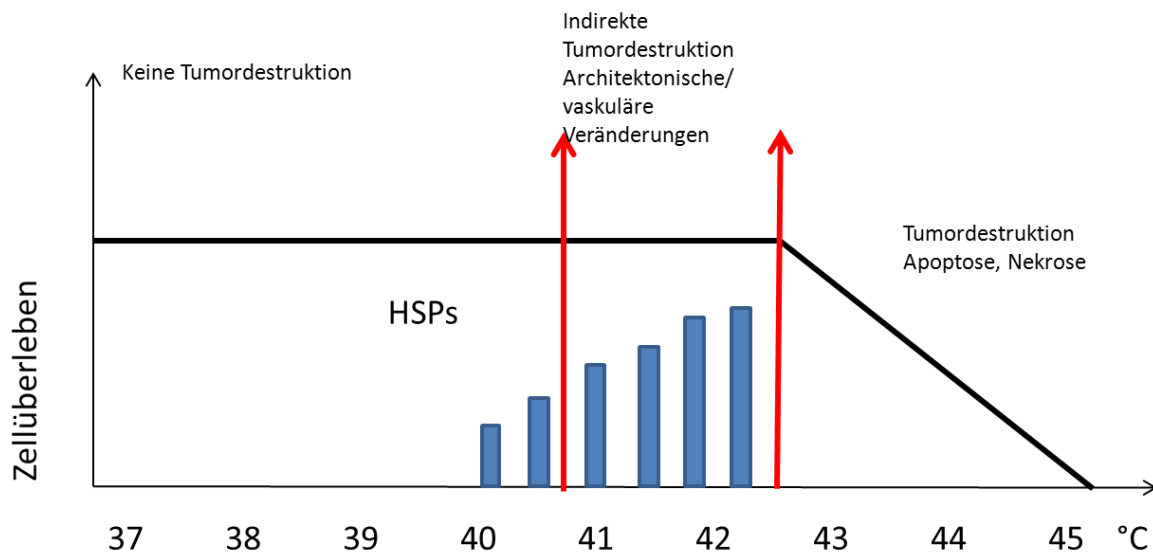


Abbildung 6: Darstellung der temperaturabhängigen Vorgänge innerhalb der Tumorzelle in Bezug auf das Zellüberleben.

Unterhalb der „breakpoint“-Temperatur von 42,5 °C (sublethale Temperaturen) beruht der antitumoröse Effekt nicht auf direkter Toxizität, sondern kommt durch architektonische/vaskuläre Umbauten mit der Konsequenz der Sensitivierung der Zellen gegenüber Chemo- und Radiotherapie zustande. Steigt die Temperatur über 42,5 °C, hat dies eine Zelledestruktion im Sinne der Apoptose und Nekrose zur Folge. Im sublethalen Bereich kommt es außerdem zur Induktion der Hitzechockproteine (Hsps). (nach Issels, 2008)^[46]

1.3.2 Die Hitzechockproteine

Die Hitzechockproteine (Hsps) wurden erstmals als eine Gruppe von Proteinen in den Speicheldrüsen der Drosophila-Fliege nach Hitzechock durch Ritossa 1962 entdeckt. Seither bestätigten zahlreiche Untersuchungen die Expression dieser Hsps in allen Organismen als Antwort auf Stresseinflüsse unterschiedlichster Art, wie z.B. Hitzechock, oxidativer Stress, Schwermetalle oder auch pathologische Zustände der Ischämie oder Inflammation, zum Schutz der Zelle.

Neben diesen induzierbaren Hsps liegen in der Zelle jedoch auch konstitutiv exprimierte Hsps vor, die unter physiologischen Zuständen in der Zelle nachweisbar sind. Besonders im Bereich der Onkologie scheinen diese Hitzechockproteine eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus des Krebses zu spielen^[48].

Durch den Einfluss von Stress, z.B. Hyperthermie, kommt es zu einer Verschiebung des Proteingleichgewichts innerhalb der Zelle zugunsten denaturierter oder intermediärer Proteinzustände, was zur Aktivierung der sogenannten Hitzeschock-Gene führt, die wiederum die Hsps kodieren. Dieser Vorgang wird auch als Hitzeschockantwort oder induzierte Thermotoleranz bezeichnet, da die Proteine die Zelle vor erneutem Stress sowie der Apoptoseinduktion schützen.

Die Aktivierung dieser Gene steht unter dem Einfluss bestimmter Transkriptionsfaktoren, die der Hitzeschockfaktor (HSF)-Familie angehören. Bisher sind drei verschiedene Transkriptionsfaktoren bekannt, die als Hsf-1, Hsf-2 und Hsf-4 bezeichnet werden ^[49, 50].

Die Hsps werden anhand ihres molekularen Gewichts in verschiedene Klassen eingeteilt. So entstand die Gruppe für Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 und die Familie der kleinen Hsps, z. B. Hsp27. In jeder dieser Gruppen existieren sowohl konstitutiv exprimierte als auch induzierbare Hsps und sind häufig bestimmten Kompartimenten der Zelle zugeordnet. Hsp90 beispielsweise findet sich sowohl im Zytoplasma als auch im Nucleus der Zelle, in der Gruppe der Hsp70 muss man zwischen einer konstitutiven Form (Hsc70, heat shock cognate protein) und einer induzierbaren Form (Hsp70) unterscheiden. Die konstitutiv exprimierten Hsps finden sich vor allem in verschiedenen Multiproteinkomplexen in Kombination mit zahlreichen Kofaktoren wieder ^[50-55].

Die Hauptaufgabe der Hsps besteht vor allem in ihrer Funktion als molekulare Chaperone.

Die molekularen Chaperone besitzen die Eigenschaft, Strukturen und Interaktionen anderer Proteine zu modifizieren und sind dadurch in den Bereich der Proteinfaltung, Translokation durch intrazelluläre Membranen und Refaltung von intermediären Proteinzuständen zur Vermeidung der irreversiblen Aggregation eingebunden. Dabei kommen den einzelnen Hsps dennoch unterschiedliche Aufgaben zu (Tabelle 2).

1.3.2.1 *Hsp70*

Hsp70 beispielsweise ist im Bereich der Refaltung denaturierter Proteine sowie der Vermeidung der Ausbildung von Proteinaggregaten eingebunden. Durch die N-terminale ATPase-Domäne interagiert Hsp70 mit verschiedenen Co-Chaperonen, an der C-terminalen Substrat-Bindungs-Domäne mit Substraten, die bei Änderung ihrer korrekten Proteinstruktur hydrophobe Anteile präsentieren, die unter normalen Bedingungen innerhalb des Moleküls verdeckt sind^[52, 53]. Diese Bindung erfolgt durch ATP-Hydrolyse, die durch das Co-Chaperon Hsp40 stimuliert wird und wodurch die ATPase-Domäne von Hsp70 eine Konformationsänderung erfährt. Die Proteine werden durch die Bindung an Hsp70 stabilisiert und hierdurch die Aggregation zu unlöslichen Komplexen verhindert. Die Loslösung der Substrate erfordert erneut die Bindung von ATP, wobei die Substrate im Folgenden entweder wieder gebunden und gelöst oder zur nativen Konformation gefaltet werden. Diese komplexen Vorgänge werden durch weitere Co-Chaperone (Hip/Bag1) durch Stabilisierung verschiedener ATP-abhängiger Hsp70-Zustände reguliert^[49, 52, 53] (Abbildung 7).

1.3.2.2 *Hsp90*

Hsp90 zeigt zwar ähnliche Aufgaben wie Hsp70 und ist ebenfalls im Bereich der Proteinfaltung intermediärer Zustände tätig, jedoch fehlt Hsp90 die Fähigkeit der Refaltung bereits denaturierter Proteine. Auch wird Hsp90 eine Rolle bei der Interaktion mit Signalmolekülen und Komponenten des Zellzyklus zugeschrieben. Die Bindung der Substrate an Hsp90 verläuft zunächst ATP-unabhängig, allerdings wird zur Loslösung eine ATP-Hydrolyse notwendig. Co-Chaperone wie Hop und p23 sind an diesem komplexen Bindungs- und Loslösungsvorgang beteiligt^[53].

1.3.2.3 *Hsp27*

Hsp27 hingegen funktioniert ATP-unabhängig und agiert mit ungefalteten Proteinen, um sie in einem sicheren intermediären Zustand zu halten, allerdings sind weitere Reaktionen mit diesen gebundenen Proteinen wiederum von Hsp70 abhängig. Die Aktivität als Chaperon wird durch hitzeinduzierte Veränderungen der Phosphorylierung und Oligomerisierung

reguliert. Auch im Bereich der Thermotoleranz stellt Hsp27 einen wichtigen Faktor dar, ebenso wie im Bereich der Regulierung verschiedener Signaltransduktionswege im Rahmen der Apoptose ^[50].

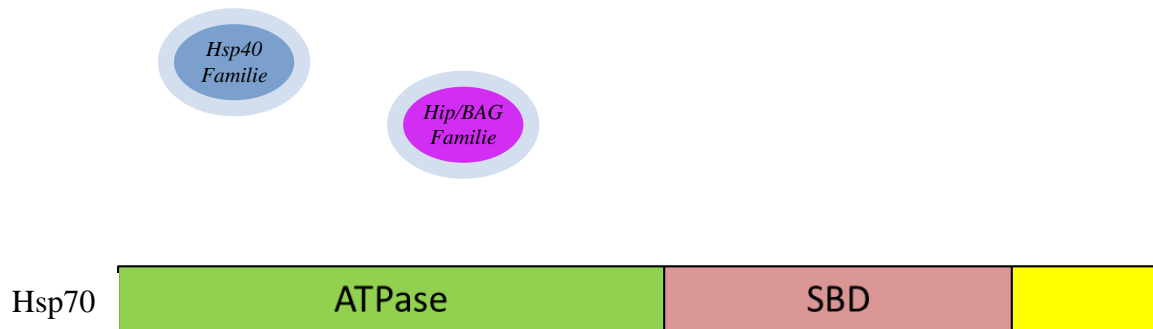


Abbildung 7: Darstellung der Hitzeschockproteine am Beispiel von Hsp70

Hsp70 besteht aus einer etwa 45 kD schweren, N-terminalen ATPase Domäne, einer 15-18 kD schweren Substratbindungsdomäne (SBD) und einer ca. 10 kD schweren C-terminalen Domäne. Durch Co-Chaperone wie Hsp40 und die Hip/BAG Familie wird die Bindung von Substraten stimuliert und organisiert. (nach Kelley, 1999)^[56]

Hsp	Funktion	Referenz
Hsp27	Interaktion mit aggregierten Proteinen, Unterdrückung der Hitzeinaktivierung der Proteine, antiapoptotische Aktivität, Gewährung der Thermotoleranz, ATP-unabhängig	C. Jolly <i>et al.</i> , 2000 D. Mosser <i>et al.</i> , 2004
Hsp40	Cochaperone von Hsp70	C. Jolly <i>et al.</i> , 2000
Hsp60	Vereinfachung der Proteinfaltung zum nativen Status, Kofaktor proteolytischer Systeme	B. Bukau <i>et al.</i> , 1998 C. Jolly <i>et al.</i> , 2000
Hsp70	Unterteilung in Hsc70 (konstitutiv) und Hsp70 (induzierbar) Autoregulation der Hitzeschockantwort, Interaktion mit neusynthetisierten Proteinen, Funktion im interorganellen Transport, Signaltransduktion, Refaltung von denaturierten Proteinen, antiapoptotische Aktivität, Rolle im Zellzyklus/Proliferation	B. Bukau <i>et al.</i> , 2006 C. Jolly <i>et al.</i> , 2000 E. Nollen <i>et al.</i> , 2002
Hsp90	Beteiligung an der Signaltransduktion durch Interaktion mit Hormonrezeptoren oder Tyrosinkinase, Autoregulation der Hitzeschockantwort, Rolle im Zellzyklus und der Proliferation, Stabilisierung intermediärer Proteinzustände, Kooperation mit Hsp70 und Hsp40	B. Bukau <i>et al.</i> , 1999 D. Mosser <i>et al.</i> , 2004 C. Jolly <i>et al.</i> , 2000 E. Nollen <i>et al.</i> , 2002
Hsp100	Beteiligung im Bereich der Stresstoleranz, Wiederherstellung der Funktion von inaktivierten aggregierten Proteinen	C. Jolly <i>et al.</i> , 2000

Tabelle 2: die Hitzeschockproteine und ihre Funktionen in gestressten Zellen

1.3.2.4 Hitzeschockproteine in der Onkologie

Wie bereits erwähnt, scheinen die Hsps auch im Bereich der Onkologie eine bedeutende Rolle zu spielen. Hsps sind in zahlreichen malignen Zellen verschiedener Tumore (Uterus, Brust, Niere, Osteosarkom, verschiedene Leukämien) erhöht und mit einer schlechteren Prognose hinsichtlich des Überlebens und des Ansprechens auf eine Therapie verbunden ^[49, 50].

Auch in diesen Zellen spielt die erhöhte Hsp-Expression, welche vermutlich im Rahmen der suboptimalen zellulären Bedingungen eines Tumors entsteht, eine entscheidende Rolle zum Schutz der Zelle vor Apoptose sowie durch die Eigenschaft der Hsps als Chaperone hinsichtlich der Dysregulation des Zellzyklus ^[48]. Hsf-1, einer der bereits erwähnten Transkriptionsfaktoren, wird in Tumorzellen ebenfalls überexprimiert und scheint an der Metastasierung und Invasion des Tumors beteiligt zu sein.

Bereits vor einigen Jahren stellte Mitsiades ^[57] einen möglichen Zusammenhang zwischen Hsp90 und einer Bortezomib-Resistenz im multiplen Myelom dar, da sich zeigte, dass durch Inhibition von Hsp90 resistente Myelomzellen gegenüber Bortezomib sensitiviert werden.

2003 konnte Chauhan ^[58] folglich eine drei- bis vierfach höhere Expression von Hsp27 in Bortezomib-resistenten Lymphomzellen im Vergleich zu sensitiven Zellen beweisen.

Weiterführende Ergebnisse erhob schließlich auch Shringarpure ^[59], der das unterschiedliche Genexpressionsprofil in Bortezomib-sensitiven und –resistenten B-Zell-Lymphomzelllinien genau untersuchte. Hierbei richtete sich der Fokus unter anderem auch auf die Hitzeschockproteine und Proteine mit chaperonähnlicher Funktion, die in resistenten Zelllinien eine höhere basale Expression zeigten. Hsp70 beispielsweise lag in resistenten Zelllinien in bis zu achtfach höheren Mengen vor als in sensitiven Zelllinien.

Ghobrial und Valbuena ^[55, 60] konnten letztlich auch im Mantelzelllymphom eine Überexpression der Hsps nachweisen. Besonders Hsp90 scheint mit dem high-grade-type der NHL assoziiert zu sein. In normalen Zellen wird Hsp90 im Zytoplasma exprimiert und ist im Bereich der Proteinhomeostase involviert. Hierbei liegen jedoch sehr niedrige Mengen an Hsp90 vor, welche auch keine Komplexe mit anderen Chaperonen bilden. In neoplastischen Zellen, unter anderem beim Mantelzelllymphom, hingegen findet sich Hsp90 in bis zu zehnmal höheren Mengen wieder, meist in großen Komplexen mit anderen Chaperon-Proteinen, den sogenannten Multichaperon- oder Superchaperonkomplexen, formiert, worauf sich die Vermutung begründet, dass Hsp90 der Zelle durch Interaktion mit zahlreichen, an der Onkogenese beteiligten Proteinen einen Überlebensvorteil bietet ^[55].

Im Rahmen dieser Erkenntnisse ist es nicht überraschend, dass sich der Fokus neuer Therapieansätze besonders auf die Inhibition der Hitzeschockproteine richtet. In diesem Zusammenhang zeigte beispielsweise Zaarur 2006 ^[61], dass die Hitzeschockantwort, welche selbst durch Hsp90- oder Proteasomen-Inhibitoren induziert wird, einen entscheidenden Faktor im Rahmen der Medikamentenresistenz darstellt. Durch Inhibition der Hitzeschockantwort, die durch Blockade des entscheidenden Gens Hsf-1 erzielt wird, können Krebszellen gegenüber der verwendeten Substanz sensitiviert werden (Tabelle 3).

Referenz	Gen/Protein	Funktion
Mitsiades <i>et al.</i> , 2002	Hsp90	Resistenz gegenüber Bortezomib im multiplen Myelom, Inhibition von Hsp90 führt zur Sensitivierung gegenüber Bortezomib
Chauhan <i>et al.</i> , 2003	Hsp27	Resistenz gegenüber Bortezomib in Lymphomzellen
Ghobrial <i>et al.</i> , 2005 Valbuena <i>et al.</i> , 2005	Hsp90	Resistenz gegenüber Bortezomib im Mantelzelllymphom
Shringarpure <i>et al.</i> , 2006	Hsp70	Resistenz gegenüber Bortezomib in B-Zell-Lymphomzellen
Zaarur <i>et al.</i> , 2006	Hsf-1	Inhibition von Hsf-1 führt zur Sensitivierung von Krebszellen gegenüber Hsp90- und Proteasomeninhibitoren

Tabelle 3: die Rolle der Hitzeschockproteine hinsichtlich der Resistenz verschiedener Non-Hodgkin-Lymphome gegenüber Medikamenten.

1.3.3 Hyperthermie und das Proteasom

Neben der durch Hyperthermie erfolgten Induktion des Zelltods sowie der Hsps richtete sich der Fokus verschiedener Studien auf weitere durch Hyperthermie induzierte Effekte.

Hierunter zählt auch die Wirkung von Hitze auf das bereits oben beschriebene Proteasom, welches im Rahmen der Apoptose bzw. des Zellzyklus eine wichtige Rolle spielt und auch unter Hyperthermie durch den Abbau der denaturierten Proteine von entscheidender Bedeutung ist.

Kuckelkorn entdeckte bereits 2000 in Mauszellen ^[62], dass es nach Hitzeschock innerhalb der Zelle zunächst zu qualitativen Veränderungen kommt, die sich beispielsweise in Form einer zellulären Umverteilung der Proteasomen sowie einer Beeinflussung der Eintrittspforte des 26S-Proteasoms und einer Minderung seiner Aktivität ausdrücken. Darüber hinaus erkannte er, dass es wider Erwarten nicht zu einem Anstieg der Proteasom-Komponenten kommt, obwohl man zunächst durch die Steigerung denaturierter Proteine davon ausgegangen war.

Pajonk analysierte 2005 ebenfalls den Effekt der Hyperthermie auf die Proteasomen-Aktivität in humanen Prostata-Krebszellen ^[63]. Hierbei zeigte sich bei einer Behandlung mit 44 °C/60 Minuten eine nahezu vollständige Inhibition der NF-kB-Aktivität durch Stabilisierung von IκB, was letztlich auf eine Proteasom-Inhibition zurückzuführen war. Im 26S-Proteasom entdeckte Pajonk folglich eine thermosensitive Komponente in der 19S Untereinheit, die durch Hyperthermie beeinflusst wird.

Glickman beschrieb 2005 ebenfalls einen inhibitorischen Effekt von starkem Hitzeschock auf das Proteasom, indem es zur Dissoziation der 20S- und 19S-Untereinheiten kommt und der intrazelluläre Proteinabbau dadurch erliegt. Die Untereinheiten werden dadurch allerdings nicht abgebaut und formieren sich nach Fortschreiten des Zellzyklus neu ^[34].

Im Rahmen milder Hyperthermie hingegen wird die Aktivität des Proteasoms gesteigert ^[34, 63] (Tabelle 4).

Referenz	Temperatur	Zellmodell	Effekt auf das Proteasom
Kuckelkorn <i>et al.</i> , 2000	42 °C/25 Minuten	Mauszellen	Zelluläre Umverteilung, Minderung des ‚de novo‘ Aufbaus, Minderung der Aktivität durch Veränderung der Eintrittspforte
Pajonk <i>et al.</i> , 2005	44 °C/60 Minuten	Humane Prostatakrebszellen	Minderung der Aktivität durch Blockade einer thermosensitiven Einheit im 19S RP
Glickman <i>et al.</i> , 2005	Starker Stress Milder Stress	-	Dissoziation in 19S- und 20S-Einheit mit Abnahme der intrazellulären Proteolyse Anstieg des Proteasomlevels

Tabelle 4: Übersicht über den Einfluss von Hyperthermie auf das Proteasom.

1.3.4 Klinische und technische Anwendung der Hyperthermie

Durch die stetige Weiterentwicklung der Verfahren und Verbesserung des Thermomonitorings während der Anwendung konnte die Applikation der Hyperthermie zunehmend in den klinischen Therapiebereich eingebunden werden.

Im klinischen Behandlungsbereich kommen sehr unterschiedliche Formen der Hyperthermieanwendung zum Einsatz, wodurch Temperaturen zwischen 40 °C und 44 °C innerhalb des Tumors erreicht werden können. Die Auswahl des Verfahrens ist von der Tumorentität und –lokalisierung abhängig und kann individuell mit Radiotherapie oder Chemotherapie kombiniert werden ^[64].

Während bei älteren, invasiven Maßnahmen der Perfusion angewärmtes Blut in den entsprechenden Körperabschnitt geleitet wird, ist es mittlerweile auch möglich, die Wärme von außen gezielt zu applizieren. Hierbei macht man sich beispielsweise die Wirkung elektromagnetischer Wellen zu Nutze, wodurch es durch Energieabsorption im Feldbereich des Applikators der Hyperthermie zur Überwärmung kommt, während die Blutperfusion im Gewebe und Tumor durch Abtransport der Wärme der Hyperthermie entgegenwirkt. Abhängig von den unterschiedlichen Perfusionsverhältnissen innerhalb des Tumors werden hierbei folglich Temperaturen zwischen 40 °C und 44 °C erreicht.

Daneben gibt es jedoch auch noch weitere Verfahren, die besonders der Tiefenhyperthermie dienen. Durch die Anwendung von kapazitiven oder radiativen Antennen, die kreisförmig um den Körper des Patienten angelegt sind, können die erzeugten Wellen auf die Mitte der Antennenöffnungen fokussiert werden und führen somit zu einer gezielten Temperaturerhöhung.

Doch auch die Ganzkörperhyperthermie hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Dank der Weiterentwicklung hochkomplizierter Systeme, wie beispielsweise heißwasserdurchspülte Röhrensysteme, wurde eine relativ komplikationslose Ganzkörperhyperthermie möglich, die einen systemischen Temperaturanstieg im Bereich der „fever-range“ (39,5 °C) ermöglicht.

Um nun die erzielte und gewollte Temperatur innerhalb des Gewebes zu gewährleisten, kommen verschiedene Messsysteme zum Einsatz. Während mittels der Magnetresonanzbildgebung Temperaturveränderungen nichtinvasiv in tiefliegenden Geweben ermittelt werden, können mit dünnen Kunststoffkathetern, welche direkt in das Tumorgewebe implantiert und mit Thermistoren bestückt werden, invasiv Temperaturen gemessen werden.

Darüber hinaus lassen sich bei soliden Tumoren, die in enger Nachbarschaft zu Hohlräumen wachsen, endoluminale Temperatursonden einbringen.

Bei der Ganzkörperhyperthermie wird die systemische Temperaturerhöhung durch Messung der Kerntemperatur entweder über Sonden rektal, axillär oder ösophageal oder über zentralvenöse bzw. arterielle Sonden gemessen ^[47].

1.3.5 Aktuelle Anwendung der Hyperthermie in der Onkologie

In vergangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Einbindung der Hyperthermie in vorhandene Therapiekonzepte zu einer Chemo- und Radiosensibilisierung führt.

In Kombination mit alkylierenden Substanzen, Nitroharnstoffen und Platin-haltigen Medikamenten zeigt die Anwendung der Hyperthermie mehr als einen additiven Effekt. Im Falle von Cisplatin führte die gleichzeitige Anwendung mit Hyperthermie sogar zu einer Aufhebung der Cisplatin-Resistenz ^[65, 66]. Diesbezüglich scheint es nahe liegend, dass die Einbindung der Hyperthermie in das klinische Therapiekonzept hilfreich bei Medikamenten-resistenten Erkrankungen sein kann (Tabelle 5).

In einer multizentrischen randomisierten Phase III Studie untersuchten Issels *et al.* ^[67] die Effektivität der Kombination einer neoadjuvanten Chemotherapie mit regionaler Hyperthermie bei Patienten mit einem lokalisierten Hochrisiko-Weichteilsarkom. Hierzu wurden insgesamt 341 Patienten in die Studie eingeschlossen, wovon 169 eine Dreifachchemotherapie nach dem EIA-Regime (Etoposid, Ifosfamid und Doxorubicin) mit anschließender regionaler Hyperthermie erhielten und 172 nur mit Chemotherapie nach obigem Schema behandelt wurden. Nach einer durchschnittlichen Beobachtungszeit von 34 Monaten konnten beachtliche Ergebnisse erhoben werden. Während 76 Patienten der Gruppe mit alleiniger Chemotherapie ein lokales Tumorwachstum zeigten, begrenzte sich diese Zahl auf 56 Patienten in der Gruppe der kombinierten Therapie. Hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens konnte nach zwei Jahren eine absolute Differenz von 15% (76% Kombinationsgruppe vs. 61% Chemotherapie allein) erhoben werden. Auch in Anbetracht der krankheitsfreien Phase stellte sich ein deutlicher Vorteil (32 vs. 18 Monate) der Gruppe der Kombinationstherapie heraus. Das Gesamtansprechen auf die Induktionstherapie lag bei den Patienten der Kombinationstherapie bei 28,8%, während in der Gruppe der alleinigen Chemotherapie dieser Wert bei 12,7% lag.

In Anbetracht dieser Ergebnisse zeigte sich, dass die Kombination von Hyperthermie und Chemotherapie bei Patienten mit Hochrisiko-Weichteilsarkom einen deutlichen Vorteil erbringt.

In einer weiteren Studie wurde die Wirksamkeit der Hyperthermie in Kombination mit Radiotherapie bei Patienten mit Zervixkarzinom untersucht ^[68]. Im Vergleich zur Radiotherapie allein zeigte sich bezüglich der kompletten Remissionen (83% versus 57%) sowie des Gesamtüberlebens (51% versus 27%) ebenfalls ein signifikanter Vorteil der Kombinationstherapie.

Ebenfalls signifikant waren die Ergebnisse der Kombination von Hyperthermie und Radiotherapie bei Melanomerkrankungen. Auch hier zeichnete sich ein deutlicher Vorteil bezüglich der kompletten Remissionen (62% versus 35%) und des lokalen rückfallfreien Überlebens (46% versus 28%) ab ^[69].

So ist folglich der Hyperthermie ein beachtlicher Stellenwert in der Ergänzung zu bereits vorhandenen Therapiemodalitäten zuzuschreiben, vor allem aber auch die Wirksamkeit in Kombination mit neuen, vielversprechenden Therapieformen zu untersuchen.

Substanz	Interaktion	Anmerkung
Cisplatin	mehr als additiv	Gradueller Anstieg mit steigender Temperatur, größter Effekt bei simultaner Anwendung.
Cyclophosphamid	mehr als additiv	Gradueller Anstieg mit steigender Temperatur, größter Effekt bei simultaner Anwendung.
Carmustine (BCNU)	mehr als additiv	Größter Effekt bei simultaner Anwendung
Bleomycin	mehr als additiv	Nur bei Temperaturen > 42 °C, größter Effekt bei simultaner Anwendung
Doxorubicin	komplex	Effekt weniger als additiv bei vorheriger Applikation der Hyperthermie
5-Fluorouracil	unabhängig	-
Vincristin	unabhängig	-
Paclitaxel	komplex	Abhängig vom Zelltyp, nur im Temperaturbereich von 41,5 – 43 °C
Gemcitabine	additiv	Nur bei Anwendung 24 Stunden vor oder nach Hyperthermie

Tabelle 5: Übersicht über ausgewählte Medikamente, die eine Interaktion bei Kombination mit Hyperthermie Zeigen. (nach Issels, 2008)^[46]

2 Ziel der Untersuchungen

Das 26S-Proteasom spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus und in der Apoptose, indem es die intrazelluläre Proteinhomöostase aufrechterhält. Dadurch rückt das 26S-Proteasom in den Fokus neuer antitumoröser Therapien. Neue Chemotherapeutika wurden entwickelt, um das Fortschreiten des Zellzyklus durch Inhibition des Proteasoms zu unterbrechen. Neben mehreren inhibitorischen Molekülen stellt Bortezomib, auch unter dem Namen Velcade oder PS-341 bekannt, eine entscheidende Struktur dar. Bortezomib ist ein potenter, selektiver und reversibler Inhibitor des 26S Proteasoms, welcher bereits in verschiedenen Phase II Studien erfolgsversprechende Daten lieferte und unter anderem auch in der Behandlung des Mantelzelllymphoms zum Einsatz kommt.

Die Hyperthermie erlangte durch zahlreiche Studien einen neuen Stellenwert in Bereich multimodaler Therapiekonzepte solider Tumore. Die grundlegende Wirkung basiert auf der temperaturabhängigen Induktion des Zelltods in Tumorzellen durch direkte Zytotoxizität sowie Radio- und Chemosensitivierung.

Durch Anhebung der Temperatur werden Proteine denaturiert, die folglich Aggregate formen und zur Destruktion der Zelle im Rahmen der Apoptose und Nekrose führen. Die Induktion der Hitzeschockproteine stellt einen Schutzmechanismus der Zelle auf derartige Stresseinflüsse dar. Hierdurch wird versucht, den bereits entstandenen Proteinschaden zu beheben und sich vor neuen Stresseinflüssen zu schützen.

Wie bereits weiter oben beschrieben, hat die Hyperthermie in Abhängigkeit der Temperatur auch einen inhibitorischen Effekt auf das 26S-Proteasom.

Diese Beobachtungen führen zu der Vermutung, dass die Anwendung von hoher Hitze in Kombination mit Bortezomib die Inhibition des Proteasoms steigert, was zu verstärktem Zelltod führt oder zumindest in der Aufhebung der Resistenz in Bortezomib-resistenten Zelllinien hilfreich sein kann.

Jedoch induziert Hyperthermie auch die Expression der Hsps, welche nachweislich in Bortezomib-resistenten Zelllinien in erhöhter Menge vorliegen und durch Inhibition zur Sensitivierung der Zelllinien beitragen.

In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese untersucht, ob Hitze in einer zeit- und temperaturabhängigen Art und Weise die inhibitorische Aktivität von Bortezomib in

Mantelzelllymphomzelllinien beeinflusst und in wie weit durch Induktion der Hitzeschockproteine das Resistenzverhalten der Zellen tatsächlich verändert wird.

Hierfür wurde die Interaktion von Hyperthermie und Bortezomib im Mantelzelllymphom in Abhängigkeit von der Thermaldosis, der Sequenz und Kinetik der Hitzeschockproteine sowie der Konzentration von Bortezomib eruiert.

2.1 Das Model

Verschiedene Studien beweisen die klinische Wirksamkeit von Bortezomib in Mantelzelllymphom-Erkrankungen. Demnach wurden drei verschiedene Zelllinien des Mantelzelllymphoms gewählt, die sich in ihrer Sensitivität gegenüber Bortezomib deutlich unterscheiden:

Während Jeko-1 die sensitive Zelllinie repräsentiert, wird NCEB-1 als resistente Zelllinie betrachtet. Rec-1 ordnet sich hinsichtlich der Bortezomib-Sensitivität in die Mitte von Jeko-1 und NCEB-1 ein und stellt somit eine intermediäre Zelllinie dar, wodurch sich durch die Auswahl das Verhalten bezüglich Sensitivität und Resistenz unter dem Einfluss der Hyperthermie gut vergleichen lässt.

Ghobrial ^[60] beschreibt eine deutliche Überexpression verschiedenster Proteine im Mantelzelllymphom, unter anderem von Hsp90, welches für die Untersuchung der Hyperthermie-induzierten Hsp-Expression von wichtiger Bedeutung ist. Die bereits untersuchte und vorhandene basale Expression von Hsps in Mantelzelllymphomzelllinien ist die Voraussetzung für die Studie, in der wir auch den möglichen Einfluss der Hyperthermie auf die Hsp-Expression sowie die Resistenzlage untersuchen.

Zusammenfassend stellt das Mantelzelllymphom-Model eine hervorragende Grundlage dar, um die Rolle und den Effekt der Hyperthermie auf die Bortezomib-Sensitivität oder – Resistenz zu untersuchen.

2.2 Aufbau der Studie

Um eine mögliche Resistenzentwicklung im Rahmen der Induktion der Hsps durch Hyperthermie sowie einen möglichen additiven Effekt der temperatur- und zeitabhängigen Kombination von Bortezomib und Hyperthermie zu erfassen, liegt der Schwerpunkt der Untersuchungen auf drei verschiedenen Variablen:

1. Die Thermal dosis

Die Thermal dosis ist abhängig von der Höhe der Temperatur sowie der Zeit der Anwendung.

Um die unterschiedliche Auswirkung der Hyperthermie in Abhängigkeit von der Dosis innerhalb des Tumors während der klinisch angewandten Hyperthermie-Behandlung zu repräsentieren, wurden zwei verschiedene Thermal dosen gewählt:

- **sublethal:** 41,8 °C für 120 Minuten
- **lethal:** 44 °C für 30 Minuten.

2. Die Sequenz

In Abhängigkeit des Zeitpunkts der Anwendung der Hyperthermie und der darauffolgenden Möglichkeit einer Erholungsphase repräsentiert sich das Muster der Induktion der Hitzeschockproteine. Unter dieser Voraussetzung entschieden wir uns für zwei unterschiedliche Sequenzen der Hyperthermie- und Bortezomib-Anwendung:

- A) aufeinanderfolgende Anwendung: Hyperthermie mit darauffolgender 24-stündiger Inkubation bei 37° C und anschließender Bortezomib-Behandlung
- B) gleichzeitige Anwendung von Hyperthermie und Bortezomib

3. Die Medikamenten-Konzentration

Bortezomib wurde von subtherapeutischen zu therapeutischen Konzentrationen titriert (0 - 3,125 – 6,25 – 12,5 – 25 – 50- 100 nM).

Im ersten Abschnitt der Studie lag der Fokus auf der unterschiedlichen Sensitivität der drei verwendeten Zelllinien gegenüber Bortezomib in Abhängigkeit der Konzentration.

Im Folgenden wurde das Verhalten der Zelllinien auf Hyperthermie im Rahmen der Zellviabilität und –proliferation untersucht, um im Anschluss die Expression der Hsps sowohl unter physiologischen Zuständen als auch unter Hyperthermie zu erheben.

Nach Erhebung dieser Grundlagen folgte im zweiten Abschnitt der Studie die Kombination der zwei Therapieformen auf zwei verschiedenen Wegen (Abbildung 8).

Während zum einen die Zellen zunächst mit Hyperthermie behandelt wurden, um nach einer Erholungsphase von 24 Stunden mit Bortezomib behandelt zu werden (A), wurden die Zellen im zweiten Experiment gleichzeitig der Hyperthermie- und Bortezomib-Anwendung ausgesetzt (B).

Experimentelle Aufgabenstellung

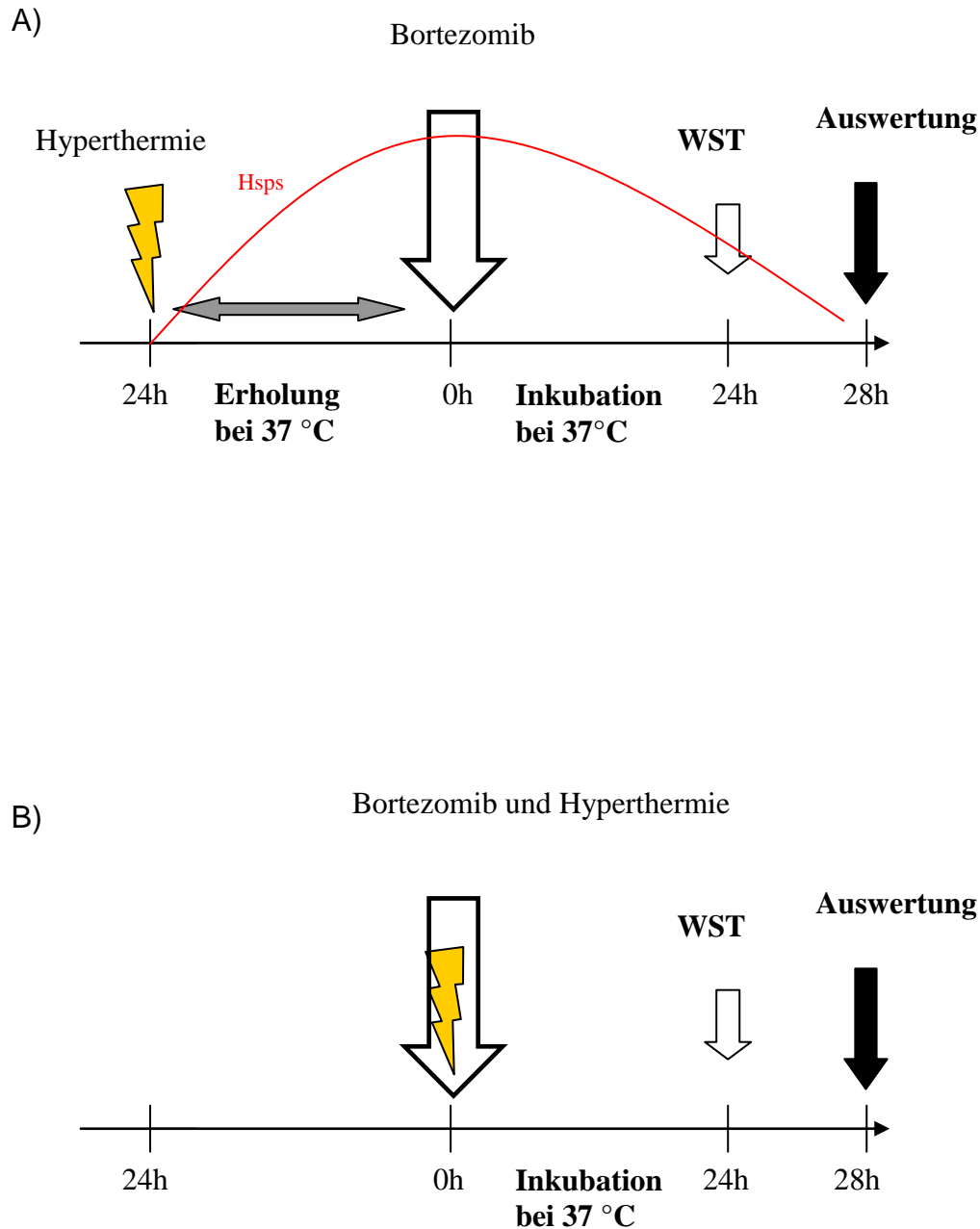


Abbildung 8: Darstellung des Versuchsaufbaus

- A) Anwendung zunächst der Hyperthermie mit anschließender Erholungsphase der Zellen für 24 Stunden bei 37 °C. Erst dann erfolgt die Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen von Bortezomib. Nach erneuter Inkubation für 24 Stunden werden die Zellen anhand des WST-1 Assays ausgewertet.
- B) Gleichzeitige Anwendung beider Therapieformen. Auch hier erfolgt die Auswertung nach 24-stündiger Inkubation anhand des WST-1 Assays.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Acrylamide 30% (Rotiphorese ® Gel 30, Roth)

Ammoniumpersulfate 10% (Merck, Darmstadt, Germany)

Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

Control Precision Plus Protein (Bio-rad, Munich, Germany)

Detection system ECL (enhanced chemiluminescence) (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany)

Glycine (Merck, Darmstadt, Germany)

Leupeptin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

Methanol (Merck, Darmstadt, Germany)

NP40 detergent (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany)

Pefablock SC (AEBSF) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

Ponceau S (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany)

PS-341 (Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA)

Rotilauf (Roti-load 1, 4 * concentrated, Roth GmbH, Germany)

Skim milk powder (Merck, Darmstadt, Germany)

Sodiumdodecylsulfate (SDS) (Bio-rad, Munich, Germany)

Tetramethylethyldiamine (TEMED) (Serva, Heidelberg, Germany)

Trichloroacetic acid (TCA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) (Merck, Darmstadt, Germany)

Trypanblue (Sigma 0,4 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany)

Tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany)

3.2 Materialien

3.2.1 Laborausstattung

Blottingchamber (Bio-rad, Munich, Germany)
Cell culture CO₂ incubator (Hera Cell, Kendro Laboratory Products)
Cell culture laminar flow (BDK, Luft-& Reinraumtechnik GmbH)
Centrifuges (Hettich, Rotixa/P, Tuttlingen)
Counting cell chamber (Neubauer, Germany)
Developing cassette (Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg, Germany)
Developing machine (Cawomat 2000 IR) (Kodak AG, Stuttgart, Germany)
Eppendorf ultracentrifuge (Heraeus, Sepatech, Biofuge 15; Centrifuge 54145, Eppendorf)
Gel electrophoresis system (Bio-rad, Mini trans blot cell)
Heating block (HLC, Haep Labor Consult, Bovenden, Germany)
Magnetic stirrer (IKAMAG RCT, IKA-Labortechnik, Staufen)
Microplate (ELISA) reader (OPTImax tunable microplate reader, Molecular Devices)
Microscope (Axiovert 25, Carl Zeiss Jena GmbH, Germany)
Multipette plus (Eppendorf, Germany)
Nitrocellulose membranes (Sartorius, Goettingen, Germany)
Pipetboy (pipetus-akku, Hirschmann Laborgeräte)
Pipettes (Cellstar, Greiner Bio-one, serological pipette)
Refrigerator (4°C, -20°C) (Liebherr Premium, Siemens Electron IC)
Refrigerator (-80°C) (Herafreeze, Heraeus, Kendro)
Shaker (KS1C Edmund Bühler, Tübingen)
Spectrophotometer (SmartSpec Plus Spectrophotometer, Bio-rad, Munich, Germany)
Vortex (Reax Top, Heidolph, Germany)
Waterbath (Julabo SW-21C)

3.2.2 Mantelzelllymphomzelllinien

Alle Zelllinien wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Deutschland bezogen.

Zelltyp [Referenzen]	Beschreibung	Ursprung
Jeko-1 [1, 70]	Mantelzelllymphomzelllinie Keine typische Translokation t(11;14)(q13;q32), aber Überexpression von Cyclin D1	Entnommen aus dem peripheren Blut einer 78-jährigen Frau mit B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom.
Rec-1 [1]	Mantelzelllymphomzelllinie Translokation t(11;14)(q13;q32) mit Überexpression von Cyclin D1	Entnommen aus einem Lymphknoten eines 61-jährigen Mannes mit terminalem refraktärem B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom
NCEB-1 [1, 71]	Zelllinie eines diffusen zentroblastisch-zentrozytischen Lymphoms Translokation t(11;14)(q13;q32) mit Überexpression von Cyclin D1 CAVE: fünf bis acht stabile Mäuschromosomen, Expression von humanem und murinem Bcl-2 Protein	Entnommen aus dem peripheren Blut eines 57-jährigen Mannes mit diffusem zentroblastisch-zentrozytischen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Mantelzelllymphomzelllinien und ihrer Eigenschaften

3.2.3 Materialien zur Zellkultur

3.2.3.1 Zellkulturmedien

RPMI 1640 with L-glutamine plus 2 g/l NaHCO₃ (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany)

20% FBS (fetal bovine serum) (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany)

1% penicillin/streptomycine (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany)

3.2.3.2 Gefäße zur Zellkultur und Plastikware

Centrifuge vials (15-50 ml) (Greiner Bio-One GmbH, Germany)

Culture flasks (175 cm²) (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Germany)

Eppendorf tubes (0,5-1,5 ml) (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany)

Freezing tubes (Nunc, Wiesbaden, Germany)

Micropipettes, Pipettes (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Germany)

3.2.3.3 Materialien zur Bestimmung der Zellviabilität

Trypanblue (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany)

Counting cell chamber (Neubauer, Germany)

Microscope (Carl Zeiss Jena GmbH, Germany)

3.2.3.4 Materialien zur Hitzeschockanwendung

Culture flasks (200 ml) (Nunc, Wiesbaden, Germany)

Parafilm M (American National Can, Chicago)

Eppendorf tubes (1,5 ml) (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany)

Waterbath (Julabo SW-21C)

3.2.4 Biochemische Materialien

3.2.4.1 Puffer und Antikörper zum Westernblot

3.2.4.1.1 Puffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

For 2 gels	Running-gel 15ml (10%)	Running-gel 15ml (15%)	Stacking-gel 5ml (5%)
H ₂ O	5,9 ml	3,4 ml	3,4 ml
30% acrylamide mix	5,0 ml	7,5 ml	0,83 ml
1,5 M Tris	3,8 ml (pH = 8,8)	3,8 ml (pH = 8,8)	0,63 ml (pH = 6,8)
10% SDS	0,15 ml	0,15 ml	0,05 ml
10% ammonium persulfate	0,15 ml	0,15 ml	0,05 ml
TEMED (tetramethyl ethylene diamine)	0,006 ml	0,006 ml	0,005 ml

Tabelle 7: Vorlage zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele

3.2.4.1.2 Puffer zur Zellyse und Lösung zum Westernblot

ELEKTROPHORESE PUFFER (10x)

720,65 g glycine

50 g Na-dodecylsulfate (SDS-Na)

151,4 g Tris

pH = 8,3 in 1000 ml H₂O

ZELLYSE PUFFER (1 ml)

150 nM NaCl

50 mM Tris

1 % NP40 detergence

pH = 8,0

1 µl Leupeptin (1:1000)

2 µl Pefablock (1:500)

PONCEAU LÖSUNG

3% trichloroacetic acid (TCA)

2% ponceau

TRANSFER PUFFER

15 g Tris (0,25 mol/l)

71 g glycine

790 g methanol

5,0 l H₂O

TRIS-BUFFERED SALINE (TBS) 10x

12,11 g Tris

88 g NaCl

pH = 7,4 in 1000 ml H₂O

TBST (TBS plus TWEEN20)

1000 ml TBS

500 µl Tween20

BLOCKING PUFFER

5% nonfat dry milk in TBST

VERDÜNNUNGSPUFFER FÜR DEN ERSTEN ANTIKÖRPER

5% nonfat dry milk in TBST

3.2.4.1.3 Antikörper zum Westernblot

Antigen	erster Antikörper; Verdünnung	zweiter Antikörper; Verdünnung	Unternehmen
HSP27	SPA-800: monoclonal mouse antibody; 1:500	goat anti-mouse IgG; 1:2000	Stressgen Bioreagents, Ann Arbor, USA Bio-Rad Laboratories, CA
HSC70	SPA-815: monoclonal rat antibody; 1:2000	mouse anti-rat IgG ; 1:2000	Stressgen Bioreagents, Victoria, Canada; Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA
HSP70	monoclonal rat antibody IgG1 6B3; 1:100	mouse anti-rat IgG; 1:2000	Elisabeth Kremmer, GSF, Munich, Germany Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA
HSP90	SPA-830: monoclonal mouse antibody; 1:1000	goat anti-mouse IgG; 1:2000	Stressgen Bioreagents, Ann Arbor, USA Bio-Rad Laboratories, CA
β-Aktin	A-2066; 1:200	Anti-rabbit IgG, NA 934; 1:2000	Sigma, Germany Amersham Biosciences, UK

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Antikörper zur Durchführung des Westernblots.

3.2.5 Materialien zur Bortezomibbehandlung

96-well culture plates (Tissue Culture Plate 96-well Flat Susp Cell, Sarstedt, Newton)

Multipette plus (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany)

Eppendorf-tubes (1,5 ml) (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany)

WST-1 assay (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)

PS-341 (Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA)

3.3 Methoden

3.3.1 Techniken der Zellkultur

3.3.1.1 Zellkultur der Mantelzelllymphomzelllinien

Alle drei Zelllinien wurden in Kulturmedium RPMI 1640 mit L-Glutamin plus 2 g/l NaHCO₃, angereichert mit 20% hitzeinaktiviertem FBS und 1% Penicillin/Streptomycin-Mischung, geführt. Zum Wachstum wurden die Zellen in 175 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und einer feuchten Atmosphäre bei 5% CO₂/95% Luft gehalten.

Während Jeko-1 und Rec-1 in kleinen einzelnen runden Zellen wuchsen, formierte sich NCEB-1 in Klumpen, welche durch leichtes Schlagen der Zellkulturflaschen vor Arbeitsbeginn zunächst gelöst werden mussten.

Alle Zelllinien wurden alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:2 bis 1:4 reduziert und mit etwa 0,5-1x10⁶ Zellen/ml neu angesetzt.

3.3.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde ein zytoprotektives Reagenz wie Dimethylsulphoxid (DMSO) verwendet, um Zellschäden durch Einfrieren und Auftauen (intrazelluläre Eiskristalle und osmotische Effekte) zu vermindern. Hierfür wurden 5-10x10⁶ Zellen zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in 1000 µl 10%iger DMSO-Lösung (DMSO in FBS) in Kryotubes resuspendiert. Die Tubes wurden auf Eis gekühlt und rasch bei -80 °C im Gefrierschrank tiefgefroren.

Zum Auftauen der Zellen wurde die Suspension schnell erwärmt, in 20 bis 25 ml Medium aufgenommen und sofort abzentrifugiert, um Reste an zytotoxischem DMSO zu entfernen. Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurde der Überstand des Zentrifugats verworfen und frisches Medium zugesetzt, worin die Zellen während der ersten Passage verblieben.

3.3.1.3 Bestimmung der Zellviabilität mittels des Trypanblau-Ausschlusstests

Die Zelldichte viabler Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau zum Ausschluss toter Zellen bestimmt. Der Test basiert auf dem Prinzip, dass viable Zellen intakte Zellmembranen besitzen, die die Aufnahme von bestimmten Farbstoffen wie Trypanblau verhindern, während tote Zellen diese Fähigkeit verloren haben. 10µl Zellsuspension werden mit 10µl Trypanblau vermischt, auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und im Durchlichtmikroskop analysiert. Viable Zellen zeigen ein transparentes Zytoplasma, tote Zellen hingegen können durch ein blaues Zytoplasma identifiziert werden. Die Zelldichte wird durch die Anzahl der Zellen in vier Großquadranten bestimmt, wobei bei einer Mischung von Zellsuspension zu Trypanblau von 1:1 folgende Formel gilt:

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

Hierbei gibt (N1) die Zellzahl in vier Großquadranten der Neubauer-Zählkammer an, (N2) die Zellzahl pro ml Zellsuspension.

3.3.2 Behandlung der Zellen mit Bortezomib und Auswertung mittels WST-1-Zellproliferationsassay

Zur Behandlung der Zellen mit Bortezomib wurden nur viable Zellen geerntet, ausgezählt und in Medium mit einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml ausgesät.

Um die Proliferation der Zellen zu messen, wurde der sogenannte WST-1 Assay verwendet. Dieser beruht auf der Metabolisierung des Tetrazoliumsalses 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat zum ringoffenen Formazansalz (Abbildung 9), was zu einem Farbumschlag führt, der kolorimetrisch ausgewertet wird. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei, so dass die Reaktion als ausreichend spezifisch bezeichnet werden kann. Weitere Spezifität kommt dadurch zustande, dass das Formazan nur von metabolisch aktiven Zellen gebildet werden kann, deren mitochondriale Dehydrogenasen das Tetrazoliumsals zum Formazansalz umbauen. Eine Steigerung der Anzahl lebender Zellen resultiert in einem Anstieg der Gesamtaktivität der mitochondrialen Enzyme in einer Probe, was zu einer vermehrten Bildung des Tetrazoliumsalses führt. Die dadurch stattfindende Änderung des Absorptionsmaximums lässt sich mit einem Spektrophotometer (ELISA-Reader) feststellen. Nachteilig wirkt sich aus, dass die Formazan-Bildung auch im Rahmen des Massenwirkungsgesetzes abläuft, so dass beispielsweise bei Inhibitor-Behandlung faktisch nie eine OD (Optische Dichte, $\text{Absorption}_{450\text{nm}} - \text{Absorption}_{690\text{nm}}$) von 0 erreicht wird. Dieser Fehler kann jedoch durch Normalisierung der erhaltenen Messwerte auf einen Blank-Wert beseitigt werden, der nur Medium und zugesetzte Reagenzien enthält.

Zur Durchführung des Tests wurden die Zellen auf die gewünschte Dichte ($1 \times 10^6/\text{ml}$) eingestellt und in 96-Well-Platten mit $100 \mu\text{l}$ der Zellsuspension ausgesät, wobei jeder Wert als Triplett angesetzt und vermessen wurde. Zusätzlich wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von Bortezomib inkubiert. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe (1:2) angelegt, in der die Konzentrationen von 3,125 bis 100 nmol/l eingestellt wurden. Von diesen Konzentrationen wurden jeweils $10 \mu\text{l}$ der Verdünnungslösung nach folgendem Muster in ein Well pipettiert (Abbildung 10):

In die unterste Reihe der Platte wurden je $10 \mu\text{l}$ der 100 nmol/l -Verdünnung pipettiert, die folgenden Reihen mit jeweils absteigender Konzentration. Die vorletzte Reihe wurde, um eine Kontrolle ohne Bortezomib zu erhalten, nur mit Zellsuspension gefüllt, die letzte Reihe als Blank-Wert nur mit Medium.

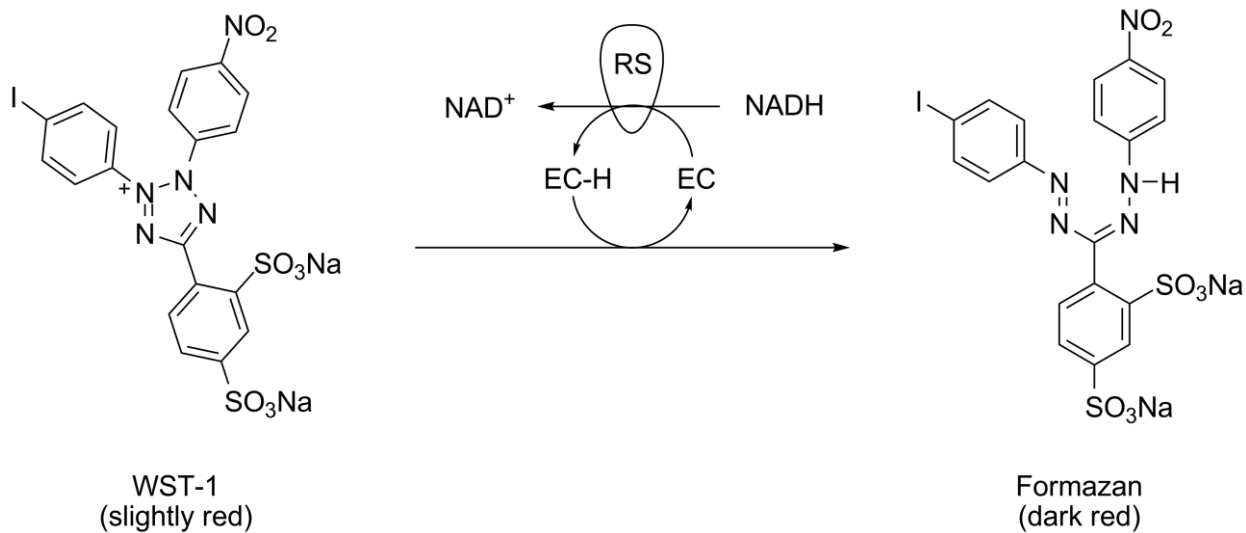


Abbildung 9: Aufspaltung des WST-1 Tetrazoliums Salzes zu Formazan.

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 viablen Zellen in der Probe (EC= electron coupling reagent, RS= mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system.).(Abbildung nach Roche Diagnostics GmbH)

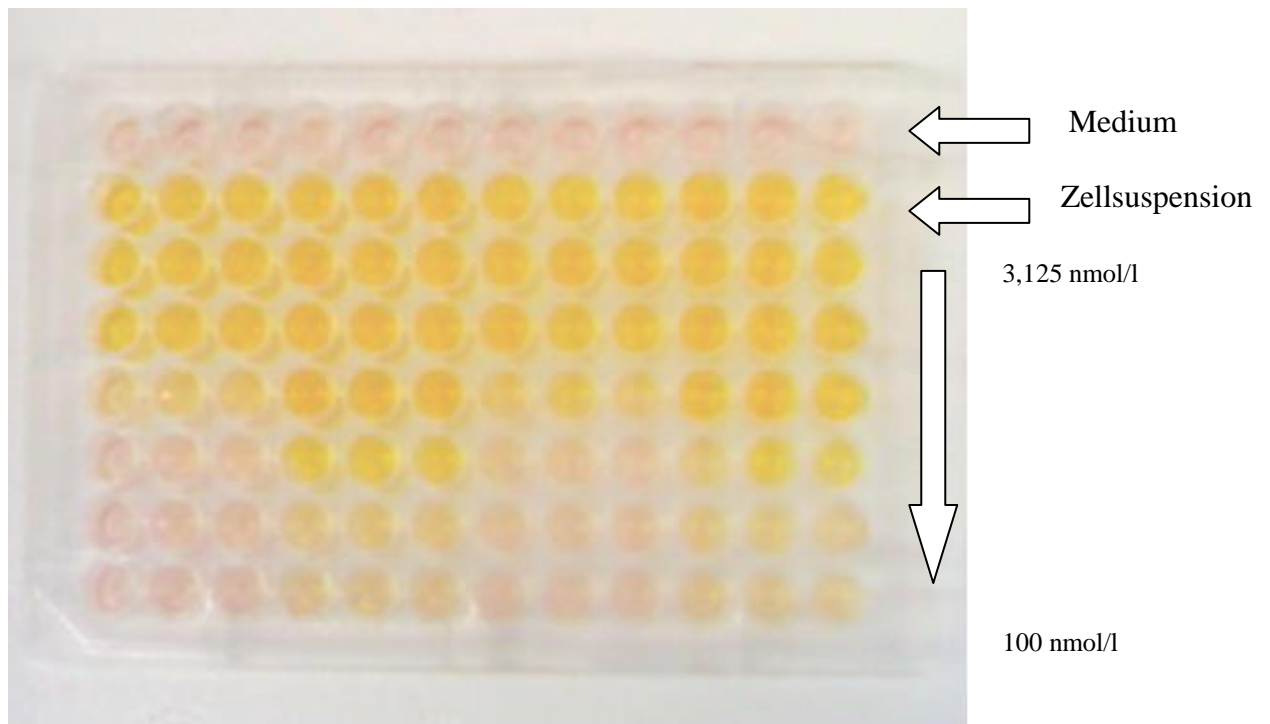


Abbildung 10: 96-well Platte zur Auswertung der Zellproliferation mittels WST-1 Assay.

Die erste Reihe wird nur mit Medium befüllt, um einen „blank“-Wert zu erzielen. Die zweite Reihe enthält nur Zellsuspension. Die folgenden Reihen werden mit je ansteigenden Konzentrationen von Bortezomib und Zellsuspension befüllt.

Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen mit 10 µl WST-1 Reagenz versetzt und nach vier- bis fünfstündiger Inkubation die OD am ELISA-Reader gemessen. Die Wellenlänge für die Messung der Absorption des Formazan-Produktes sollte, je nach am ELISA-Reader verfügbaren Filter auf einen Wert zwischen 420 und 480 nm eingestellt sein (maximale Absorption im Bereich von 440 nm), die Referenz-Wellenlänge sollte mehr als 600 nm betragen.

Aus drei erhaltenen Messwerten wurde der Mittelwert gebildet, hiervon der Mittelwert der Blank-Werte abgezogen und die sich daraus ergebenden Werte auf den Kontrollwert bezogen. Zur Bestimmung der proliferationshemmenden Potenz einer Substanz wurde der IC_{50} -Wert herangezogen, der die Konzentration eines Inhibitors angibt, bei dem die Proliferation der Zellen auf die Hälfte des Betrags der unbehandelten Zellen abgesunken ist.

3.3.3 Hitzeschockbehandlung

Für die Anwendung der Hyperthermie wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in einem Endvolumen von 10 ml in Zellkulturflaschen (200 ml) ausgesät. Die Flaschen wurden im Folgenden mit Parafilm verschlossen und in einem temperaturkontrollierten Wasserbad bei $41,8 \text{ }^\circ\text{C}$ für 120 Minuten oder bei $44 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30 Minuten direkt erwärmt. Gleichzeitig wurden Kontrollzellen angesetzt, die bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für die gleiche Zeit im Brutschrank inkubiert wurden.

Nach der Hitzebehandlung wurden die Zellen aus dem Wasserbad genommen und wiederum im Brutschrank gelagert. Die Erholungsphase dauerte bis zu 48 Stunden, danach wurden nur viable Zellen für weitere Arbeitsvorgänge verwendet. Die Zellproliferation wurde ebenfalls mittels des WST-1 Assays gemessen.

3.3.4 Gleichzeitige Anwendung von Hyperthermie und Bortezomib

Für die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Hyperthermie und Bortezomib wurden 1×10^6 Zellen/ml in 1,5 ml Eppendorf-Tubes in einem Endvolumen von 0,5 ml ausgesät. 50 μl jeder Bortezomib-Konzentration wurden kurz vor Einsetzen der Gefäße in das Wasserbad zur Zellsuspension gegeben. Danach wurden die Tubes mit Parafilm verschlossen und auf $41,8 \text{ }^\circ\text{C}$ oder $44 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt. Zur Kontrolle wurden gleiche Zellmengen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ mit jeweils den gleichen Bortezomib-Konzentrationen inkubiert.

Nach Anwendung der Hyperthermie wurden die Zellen auf die 96-Well-Platten pipettiert (100 μl Zell-Bortezomib-Lösung je Well) und anschließend für den Rest der 24 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Der weitere Ablauf entspricht der Behandlung mit Bortezomib unter 3.3.2.

3.3.5 Biochemische Analyse der Proteinexpression

3.3.5.1 Zelllyse

Zur Zelllyse wurde zu je 1 ml des Lysepuffers (150 nmol/l NaCl, 50 mmol/l TRIS, pH = 8,0, 1 % NP40 (Detergenz)) 1 µl Leupeptin (1:1000) sowie 2 µl Pefablock (1:500) zugesetzt. Eine gleiche Anzahl viabler Zellen wurde geerntet, gewaschen und anschließend in 80 µl Puffer lysiert. Im Anschluss wurden die Zellen 30 Minuten auf Eis gelagert und danach für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert.

3.3.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Um die Proteine anhand ihres molekularen Gewichts aufzutrennen, wurden je 20 µl eines jeden Zelllysats auf eine Spur des SDS-PAGE-Gels aufgetragen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit 75 Volt (15 Minuten) und folgend 150 Volt (105 Minuten) werden die Proteine zunächst im Lauffuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Als Kontrolle wird auf die erste Bahn des Gels ein Marker mit gut charakterisierten Proteinen aufgetragen, die letztlich die Identifikation des einzelnen Proteins anhand seines Gewichts erlauben.

Die Gele zur Elektrophorese müssen frisch hergestellt werden.

3.3.5.3 Westernblot Analyse

Nach der Trennung aller Proteine müssen diese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung von 75 Volt für 105 Minuten werden die Proteine vom Gel auf die anliegende Membran im Blotting-Puffer übertragen. Da die Proteine jedoch zu diesem Zeitpunkt noch nicht sichtbar sind, wird die Membran mit Ponceau-Lösung gefärbt, welche sich an die vorhandenen Proteine bindet und sie dadurch visualisiert.

Im Anschluss werden die Nitrocellulosefolien vorsichtig in TBS-Tween (0,05%) für drei Minuten entfärbt und im Folgenden für 30 Minuten mit einer Mischung aus TBS-Tween und 5% Milchpulver inkubiert, um so nichtspezifische freie Bindungsstellen zu blockieren.

Über Nacht werden die Nitrocellulosemembranen mit dem ersten Antikörper, welcher in 5%iger Milchlösung gelöst wird, bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Im nächsten Schritt werden die Membranen fünfmal für je fünf Minuten mit TBS-Tween gewaschen, um sie dann mit dem zweiten Antikörper in 5%iger Milchlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur zu inkubieren. Nach erneutem viermaligem Waschen für fünf Minuten erfolgt die Detektion der Protein/Antikörper-Komplexe durch das ECL (enhanced chemiluminescence) System. Durch Oxidation von Luminol wird Licht einer Wellenlänge von 428 nm freigesetzt, welches durch einen Autoradiographiefilm visualisiert wird.

4 Ergebnisse

4.1 Dosis-abhängige unterschiedliche Sensitivität der Mantelzelllymphomzelllinien gegenüber Bortezomib

Um die Interaktion von Bortezomib und Hyperthermie im Mantelzelllymphom zu untersuchen, testeten wir zunächst die antiproliferative Aktivität in drei verschiedenen Zelllinien. Diese wurden aus den bereits in einer Kollaborationsarbeit vorcharakterisierten Zelllinien ausgewählt ^[72].

Um die Zytotoxizität zu erfassen, wurden die Zellen mit ansteigenden Bortezomib-Konzentrationen (0 nmol/l – 50 nmol/l) inkubiert, nach 24 Stunden der Bebrütung (37 °C) geerntet und mittels des WST-1 Assays ausgewertet.

In allen drei Zelllinien konnte eine dosisabhängige Inhibition des Zellwachstums beobachtet werden, die wiederum abhängig von der Zelllinie und deren Sensitivität auf Bortezomib war.

Abbildung 11 zeigt die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zelllinien Jeko-1, Rec-1 und NCEB-1 in Abhängigkeit der Konzentration auf Bortezomib.

Demnach können die Zelllinien anhand ihrer Sensitivität gegenüber Bortezomib als stark sensitive (Jeko-1), intermediäre (Rec-1) und wenig empfindliche oder resistente (NCEB-1) Zelllinie beschrieben werden.

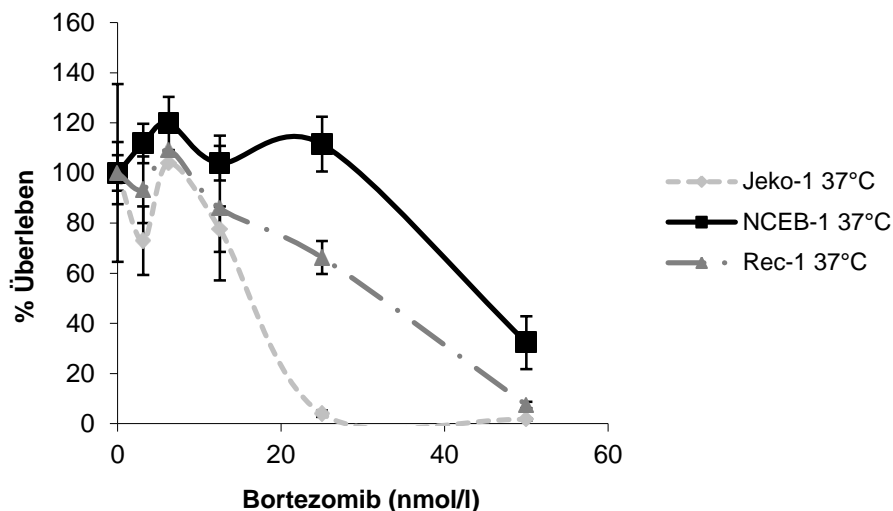


Abbildung 11: Gesamtüberleben der drei Zelllinien Jeko-1, Rec-1 und NCEB-1 in Gegenwart ansteigender Konzentrationen von Bortezomib.

Die Zellen wurden 24 Stunden mit Bortezomib-Konzentrationen im Bereich von 0 – 100 nmol/l bei 37 °C inkubiert und anschließend geerntet. Die relative Anzahl proliferierender Zellen wurde anhand des WST-1 assays erhoben. Die Abweichungen repräsentieren die mittlere +/- Standardabweichung eines Triplets eines repräsentativen Experiments.

Um die antiproliferative Wirkung von Bortezomib in Abhängigkeit der Konzentration auf die Zelllinien zu untersuchen, wurde der IC_{50} -Wert als Vergleichswert herangezogen (Tabelle 9).

Zelllinie	IC_{50} (nmol/l)
Jeko-1	$14,7 \pm 2$
Rec-1	$25,6 \pm 2$
NCEB-1	$33,8 \pm 7$

Tabelle 9: IC_{50} -Werte der jeweiligen Zelllinie nach 24 Stunden der Inkubation mit ansteigenden Bortezomib-Konzentrationen (\pm Standardabweichung).

Auch diese Werte bestätigen wiederum den unterschiedlichen Sensitivitätsgrad der einzelnen Zelllinien.

Der höchste IC₅₀-Wert konnte in NCEB-1 erhoben werden, Rec-1 nimmt erneut einen intermediären Stand ein und Jeko-1 stellt mit dem niedrigsten IC₅₀-Wert die sensitivste Zelllinie dar.

Zusammenfassend kann ein deutlicher dosisabhängiger Effekt der Bortezomibtherapie auf die Mantelzelllymphomzelllinien in Anbetracht der Zytotoxizität und antiproliferativen Eigenschaften aufgezeigt werden.

4.2 Effekte der Hyperthermie auf die Zellviabilität und das Überleben der Mantelzelllymphomzelllinien in Abhängigkeit der thermalen Dosis

Um die möglichen unterschiedlichen Effekte der Hyperthermie-Behandlung auf die drei verschiedenen Zelllinien zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Thermal Dosen (41,8 °C/120 Minuten und 44 °C/30 Minuten) gewählt. Nachdem die Zellen erhitzt wurden, wurden sie 24 Stunden bei 37 °C/5% CO₂ inkubiert, bevor sie geerntet wurden. Die Viabilität und Zytotoxizität wurden durch den Trypanblau-Exklusionstest und durch den WST-1 Assay untersucht.

Wie erwartet, hatte die geringere Temperatur (41,8 °C/120 Minuten) keinen oder nur einen minimalen Effekt auf die Zelllinien in Hinsicht auf die Viabilität und das Überleben (sublethale Thermal Dosis). Die Überlebensraten wurden als Prozentsatz der Kontrollzellen, welche bei 37 °C unbehandelt blieben, berechnet und sind in Tabelle 10 dargestellt.

Die Behandlung der Zelllinien Jeko-1 und Rec-1 mit der höheren Thermal Dosis (44 °C/30 Minuten) führte zu einer deutlichen Reduktion der Überlebensraten, NCEB-1 hingegen blieb nahezu unbeeinflusst und zeigte keine Einschränkung des Zellwachstums.

Mantelzelllymphomzelllinie ¹	Kontrolle bei 37 °C ²	Hitzeschock bei 41,8 °C/ 120 Minuten	Hitzeschock bei 44 °C/ 30 Minuten
Jeko-1	100	94,5 ± 10,7	38,3 ± 19,7
Rec-1	100	73,9 ± 7,3	28,2 ± 10,5
NCEB-1	100	111,5 ± 11,6	100,9 ± 5,1

Tabelle 10: Überlebensraten von Jeko-1, Rec-1 und NCEB-1 nach Hitzeschockbehandlung bei 41,8 °C/120 Minuten (linke Spalte) oder 44 °C/30 Minuten (rechte Spalte). Die Zellen wurden zunächst erhitzt und im Anschluss bei 37 °C im Brutschrank bei feuchter Atmosphäre für 24 Stunden inkubiert. Die Proliferationsrate wurde mittels des WST-1 Assays erhoben.

¹ Ergebnisse bilden den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten (± Standardabweichung)

² Ergebnisse stellen den Prozentsatz des Überlebens im Vergleich zu Kontrollzellen (100%) bei 37 °C dar.

Diese unterschiedlichen Überlebensmuster zeigen deutlich den Einfluss der Temperatur in Abhängigkeit der Höhe und Dauer auf die verschiedenen Zelllinien und lassen vermuten, dass NCEB-1 im Vergleich zu Jeko-1 und Rec-1 thermoresistente Eigenschaften besitzt.

4.3 Konstitutive Expression und hitzeinduzierte Überexpression der Hitzeschockproteine in Mantelzelllymphomzelllinien

Um die basale Expression der Hitzeschockproteine in den drei verschiedenen Zelllinien bei physiologischer Wachstumstemperatur von 37 °C zu vergleichen, wurden viable Zellen in gleicher Zellzahl geerntet und das Level der konstitutiv exprimierten Hsps Hsc70, Hsp70, Hsp27 und Hsp90 anhand einer Westernblot-Analyse verglichen.

Bei 37 °C wurden Hsc70, Hsp70, Hsp27 und Hsp90 in allen drei Zelllinien exprimiert. Beachtenswert war hier jedoch, dass die basale Expression des induzierbaren Hsp70 in allen Zelllinien niedrig war und NCEB-1 im Vergleich zu Jeko-1 und Rec-1 mehr Hsp27 exprimierte (Abbildung 12a).

Um nun die Kinetik und Expressionsmuster der Hsp-Induktion nach Hyperthermie in den gewählten Lymphomzelllinien zu erheben, wurden die Zellen erneut den bereits beschriebenen differenten Thermal Dosen (41,8 °C/120 Minuten und 44 °C/30 Minuten) ausgesetzt und im Folgenden für verschiedene Zeitintervalle (4, 16, 24 und 48 Stunden) bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten nach Erholungszeit geerntet und die Expression von Hsc70, Hsp70, Hsp27 und Hsp90 mittels Westernblot-Analyse erhoben (Abbildung 12b).

Die basale Expression der konstitutiv exprimierten Form der Hsp70-Familie, Hsc70, sowie Hsp90 wurde durch die Anwendung der Hyperthermie bei beiden Temperaturen nicht beeinflusst.

Hsp70, das als induzierbare Form der Hsp70-Familie gilt, zeigte eine transiente Überexpression mit einer maximalen Expression zwischen 16-24 Stunden der Erholungsphase nach Hyperthermie-Anwendung sowohl bei 41,8 °C/120 Minuten (Abbildung 12b) als auch bei 44 °C/30 Minuten (Abbildung 12c) in allen drei untersuchten Zelllinien. Hingegen zeigte sich bei Hsp27 eine deutliche Induktion nur bei Rec-1 und Jeko-1, nicht aber in NCEB-1 (Abbildung 12b und c).

Vergleicht man nun den Grad des Expressionsanstiegs der induzierbaren Hsps, so ist dieser abhängig von der angewandten Temperatur, wie sich durch den stärkeren Anstieg von Hsp70 und Hsp27 nach 44 °C/30 Minuten im Vergleich zu 41,8 °C/120 Minuten zeigen lässt (Abbildung 12b und c).

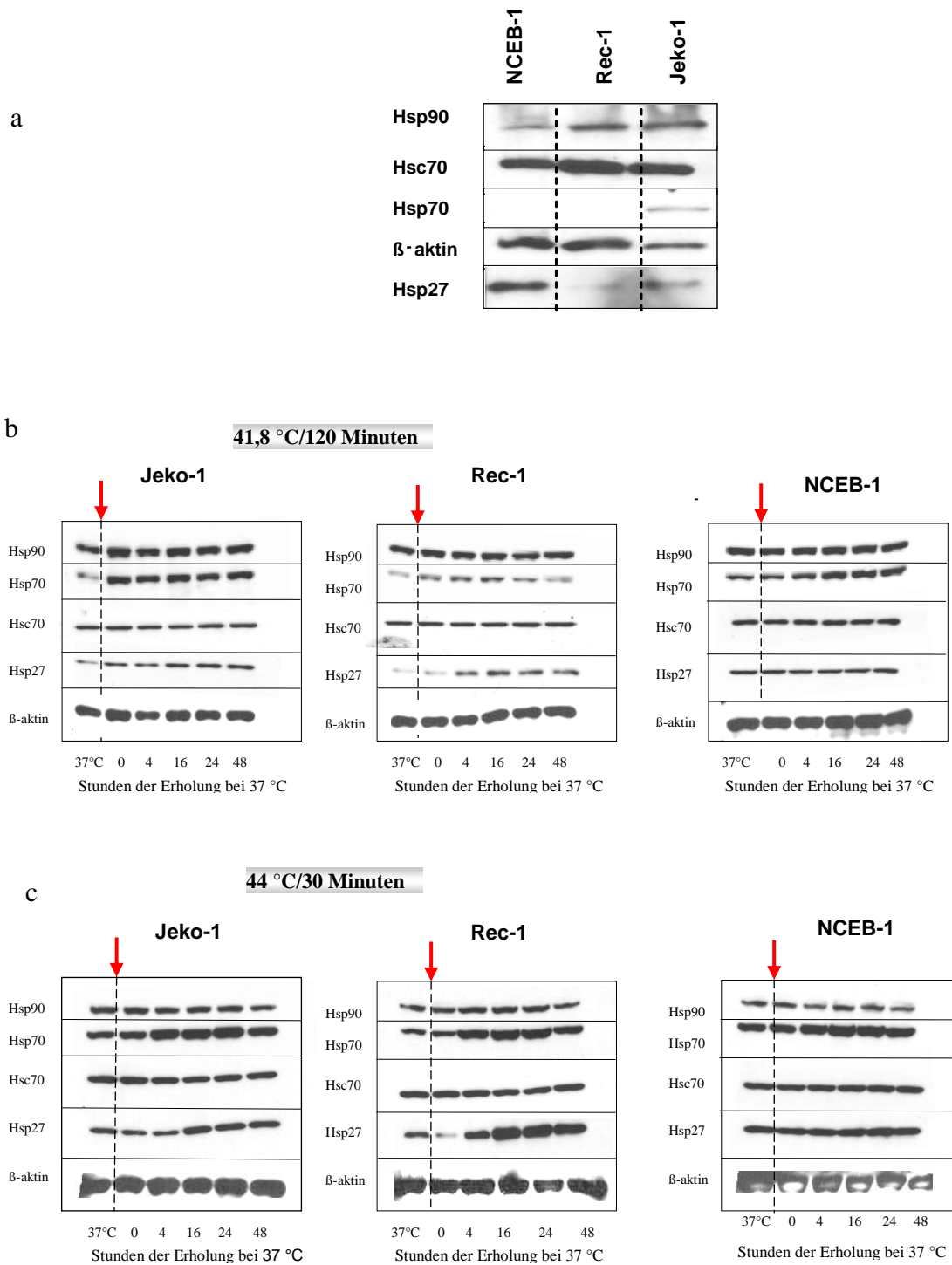


Abbildung 12: Darstellung der Expression der Hitzeschockproteine Hsc70, Hsp70, Hsp27 und Hsp90 anhand der Westernblot Analyse

- Darstellung der Expressionslevel bei 37 °C bei gleicher Zellzahl von Jeko-1, Rec-1 und NCEB-1
- Kinetik der Hitzeschockprotein-Expression nach Behandlung der Zellen mit milder Hyperthermie (41,8 °C/120 Minuten)
- Kinetik der Hitzeschockprotein-Expression nach Behandlung der Zellen mit strenger

Hyperthermie(44 °C/30 Minuten)

β-Aktin wurde als Vergleichswert der Proteinmenge aufgetragen. Nach Anwendung der Hyperthermie wurden die Zellen für bis zu 48 Stunden in feuchter Atmosphäre im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach jeweils 4, 16, 24 und 48 Stunden wurden je gleiche Mengen an Zellen geerntet und durch die Westernblot Analyse ausgewertet. Kontrollzellen wurden bei 37 °C geführt (jeweils linke Spalte).

4.4 Vorbehandlung der Mantelzelllymphomzelllinien durch Hyperthermie und die dadurch induzierte Überexpression der Hitzeschockproteine interferiert nicht mit den Effekten von Bortezomib im Mantelzelllymphom und ist unabhängig von der Thermalldosis

Um den Einfluss der induzierten, überexprimierten Hsps durch Hyperthermie auf die mögliche Induktion oder Steigerung der Resistenz gegenüber Bortezomib zu evaluieren, wurden die drei Zelllinien, welche vorbeschrieben eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Bortezomib aufweisen, zunächst entweder mit 41,8 °C/120 Minuten oder mit 44 °C/30 Minuten im Wasserbad behandelt und anschließend für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert (Erholungsphase).

Nach dieser Regenerationsphase wurden die viablen Zellen mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen erneut für 24 Stunden inkubiert. Der Effekt auf das Zellüberleben dieser kombinierten Therapiestrategie wurde anhand des WST-1 Assays erfasst.

Abbildung 13 vergleicht das Überleben von Jeko-1, Rec-1 und NCEB-1 nach Behandlung mit Bortezomib ohne Hyperthermie-Anwendung mit vorheriger (24 Stunden) erfolgter Hyperthermie bei 41,8 °C/120 Minuten oder 44 °C/30 Minuten.

Die Überlebenskurven, welche sowohl die Konzentrationsabhängigkeit als auch die entsprechenden IC₅₀-Werte der Zelllinien verdeutlichen, zeigen auf, dass der Grad der Bortezomib-Sensitivität nach Hyperthermie-Anwendung nahezu unbeeinflusst im Vergleich zu alleiniger Bortezomib-Behandlung in allen drei Zelllinien bleibt. Diese Beobachtung ist darüber hinaus unabhängig von der angewandten Bortezomib-Konzentration sowie der Temperatur-Dosis, der die Zellen ausgesetzt waren (Tabelle 11).

Zelllinie	Kontrolle	Bortezomib + Hitze bei		Bortezomib + 24 Stunden nach Hitze bei	
	37 °C	41.8 °C/120 Minuten	44 °C/30 Minuten	41.8 °C/120 Minuten	44 °C/30 Minuten
Jeko-1 ¹	14,7 ± 2	14,5 ± 1,7	13,9 ± 2,2	19,1 ± 3,5	11,8 ± 3,2
Rec-1	25,6 ± 2	30,7 ± 4,2	30,6 ± 10,6	33,7 ± 4,0 *	34,2 ± 10,9 *
NCEB-1	33,8 ± 7	34,2 ± 5,0	29,3 ± 16,6	40,7 ± 11,5	33,8 ± 9,0

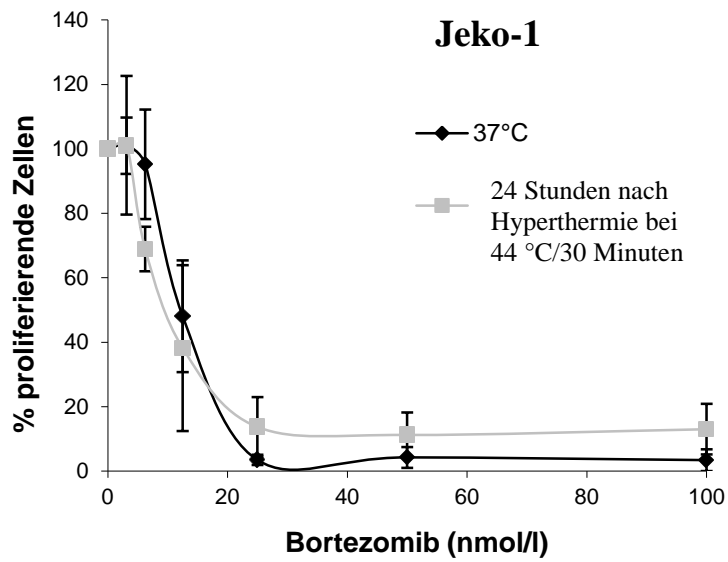
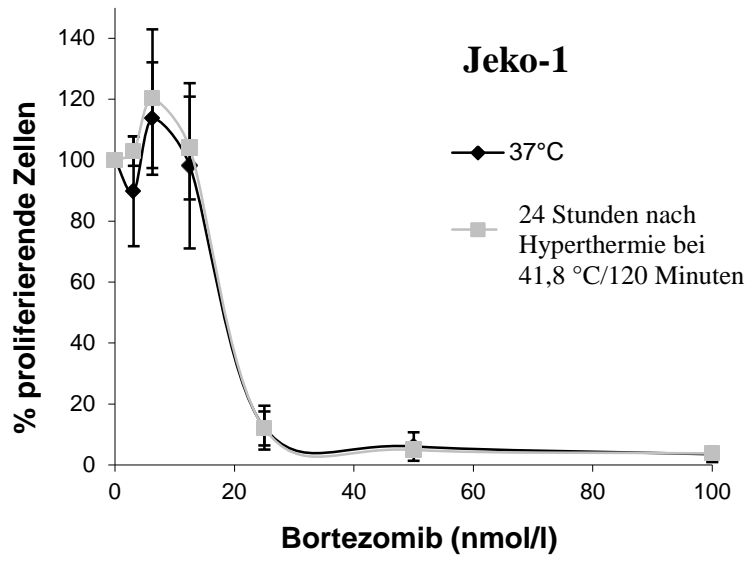
Tabelle 11: Vergleich der IC_{50} -Werte bei gleichzeitiger oder gefolgter Anwendung von Hyperthermie und Bortezomib in Abhängigkeit der Temperatur

* $p > 0.05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe bei 37 °C

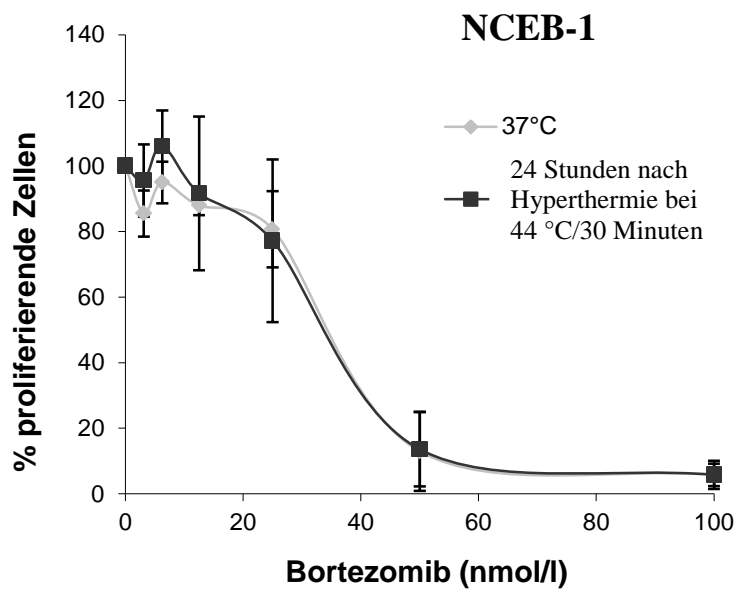
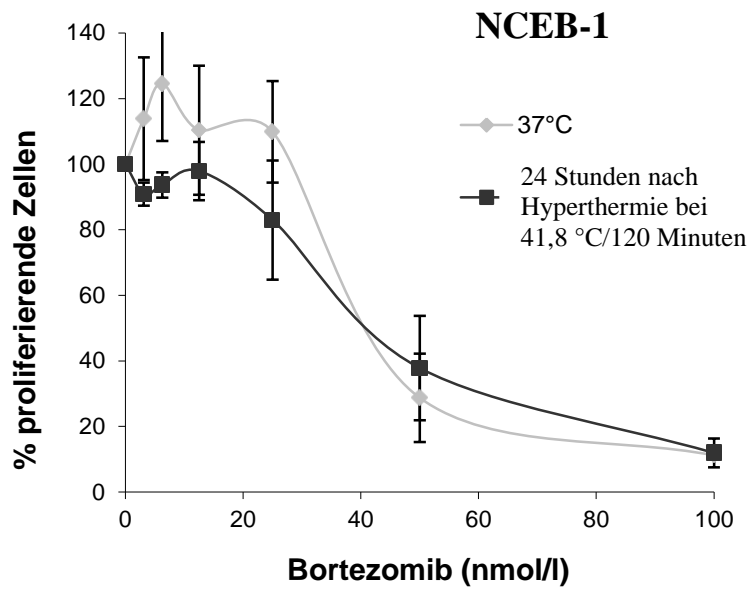
¹ Werte (nmol/l) stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar

(± Standardabweichung). Die Kontrollwerte bei 37 °C für Jeko-1, Rec-1 und NCEB-1 ergeben sich als Mittelwert von 13 bzw. 11 unabhängigen Experimenten (± Standardabweichung).

a)



b)



c)

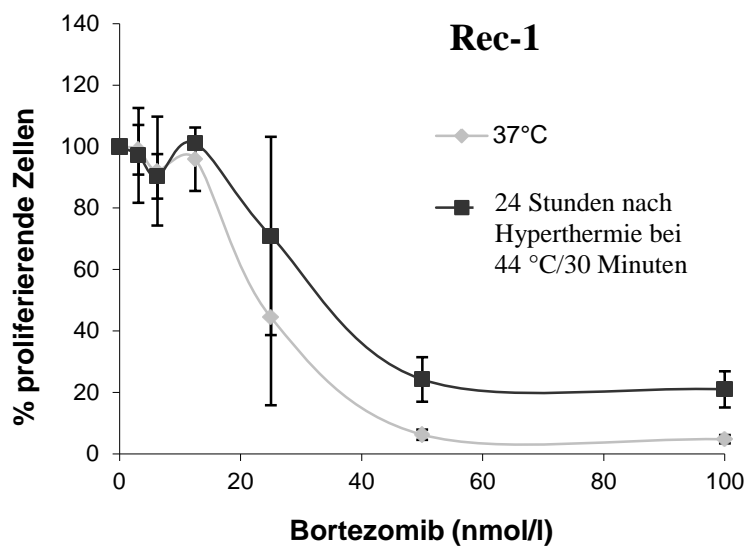
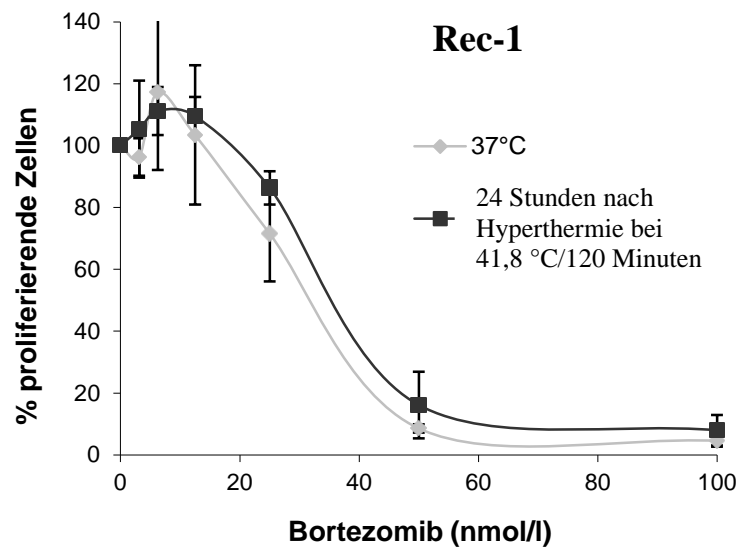


Abbildung 13: Darstellung des Zellüberlebens als Prozentsatz proliferierender Zellen in Jeko-1 (a), NCEB-1 (b) und Rec-1 (c) nach Vorbehandlung der Zellen mit Hyperthermie bei 41,8 °C/120 Minuten oder 44 °C/30 Minuten und anschließender Behandlung der Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von Bortezomib. Die Zellen wurden zunächst erhitzt und im Folgenden für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden sie mit Bortezomib-Konzentrationen von 0 bis 100 nmol/l für 24 Stunden behandelt. Die Proliferationsraten wurden mittels des WST-1 Assays bestimmt. Das Überleben ist als Prozentsatz der Kontrollzellen (keine Behandlung mit Bortezomib) dargestellt und wird mit nicht-erhitzten Zellen bei 37 °C verglichen. Darstellung der mittleren \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Der Anteil

proliferierender Zellen unterscheidet sich nicht signifikant zwischen erhitzten und nicht-erhitzten Zellen.

4.5 Die gleichzeitige Applikation von Hyperthermie und Bortezomib zeigt einen additiven Effekt in Mantelzelllymphomzelllinien

Um die gleichzeitige Anwendung von Hyperthermie und Bortezomib und deren biologischen Effekt im Falle einer Kombination zu untersuchen, wurden die Mantelzelllymphomzelllinien gleichzeitig der Hyperthermie- und Bortezomib-Therapie ausgesetzt. Auch hierbei wurden die bereits bekannten Thermal Dosen von 41,8 °C/120 Minuten und 44 °C/30 Minuten und die ansteigenden Konzentrationen von Bortezomib untersucht.

Der Effekt auf das Zellüberleben wurde auch hier anhand des WST-1 Assays erhoben und mittels der IC₅₀-Werte verglichen (Tabelle 11).

In allen drei Zelllinien zeigten sowohl der Vergleich der IC₅₀-Werte wie auch die Überlebenskurven (Abbildung 14), dass kein synergistischer Effekt unabhängig von der Zelllinie, der Thermal Dosis und der verwendeten Bortezomib-Konzentration ausgelöst wird.

Im Detail betrachtet kam es bei der Hitze- und Bortezomib-resistentesten Zelllinie NCEB-1 durch die kombinierte Anwendung beider Therapiemodalitäten zu keiner Umkehrung oder Minderung der Resistenz.

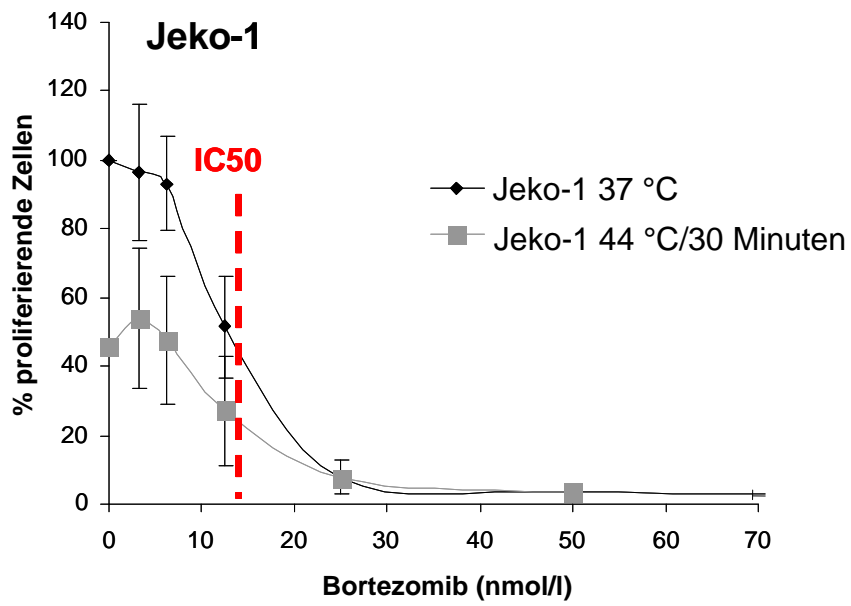
Vergleich man nun jedoch die Überlebensraten der Hitze- und Bortezomib-therapierten Zellen mit unbehandelten Kontrollzellen (37 °C), so zeigte sich ein additiver Effekt in allen drei Zelllinien besonders bei klinisch relevanten Bortezomib-Konzentrationen (< 25 nM).

Abbildung 14 zeigt das Zellüberleben als Prozentsatz der proliferierenden Zellen, die mit 44 °C/30 Minuten alleine oder in Kombination mit Hyperthermie-Bortezomib behandelt wurden.

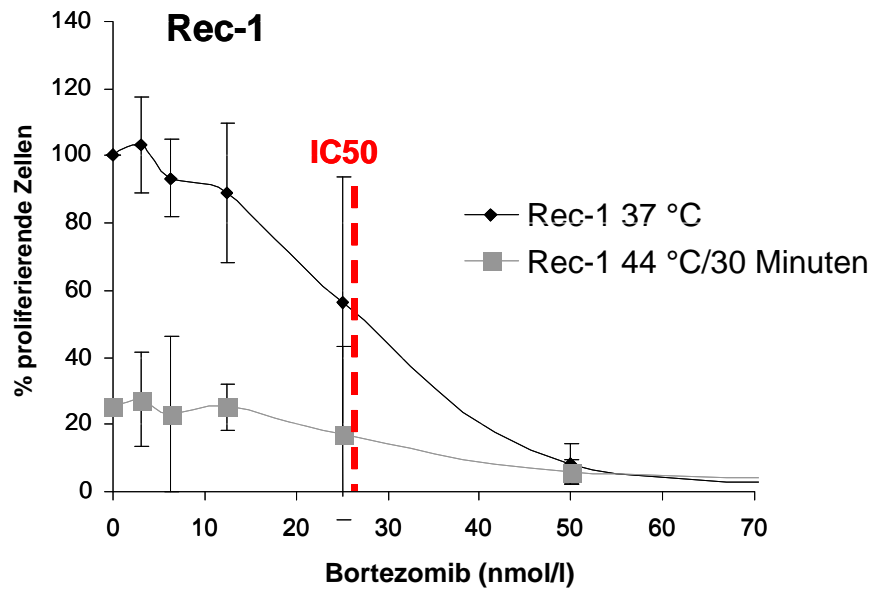
Im Bereich der IC₅₀-Konzentrationen lag das Zellüberleben in Jeko-1 und Rec-1 bei rund 20%, im Vergleich hierzu bei Kontrollzellen jedoch bei 50%, was einen klaren additiven Effekt der gleichzeitigen Applikation von Hyperthermie und Bortezomib im Vergleich zur alleinigen Bortezomibanwendung verdeutlicht.

Für die NCEB-1-Zelllinie hingegen war dieser additive Effekt im Bereich des IC₅₀-Werts nicht evident (Abbildung 14c).

a



b



c

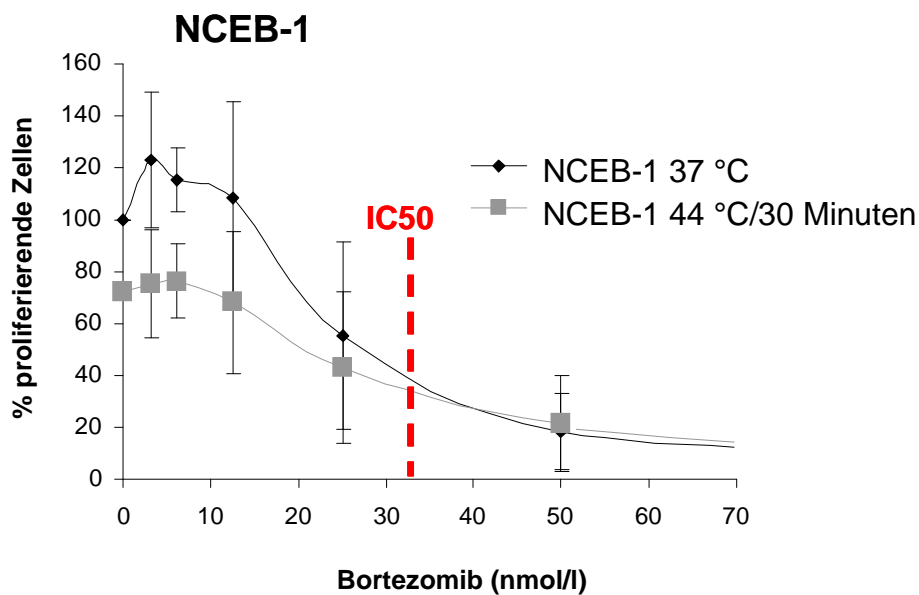


Abbildung 14: Darstellung des Zellüberlebens als Prozentsatz proliferierender Zellen in Jeko-1 (a), Rec-1 (b) und NCEB-1 (c) bei gleichzeitiger Behandlung von Hyperthermie (44 °C/30 Minuten) und Bortezomib oder Bortezomib allein bei 37 °C.

Die Zellen wurden entweder nur mit ansteigenden Konzentrationen von Bortezomib bei 37 °C oder mit zusätzlich gleichzeitiger Hyperthermie (44 °C/30 Minuten) behandelt. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und im Folgenden durch den WST-1 Assay analysiert. Darstellung der mittleren \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten. Darstellung der IC_{50} -Werte anhand der roten Linie.

Zusammenfassend lässt sich die Kombination aus Hyperthermie im Bereich letaler Temperaturen und Bortezomib als additiv, jedoch nicht als synergistisch in thermosensitiven Mantelzelllymphomzelllinien werten.

5 Diskussion

In dieser Studie wurden die zeit- und temperatur-abhängigen Effekte der Hyperthermie in Kombination mit Bortezomib in drei Mantelzelllymphomzelllinien (Jeko-1, Rec-1 und NCEB-1), welche eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Bortezomib zeigen, untersucht (Abbildung 11). Jeko-1 stellte hierbei die im Vergleich empfindliche Zelllinie dar, Rec-1 die intermediäre und NCEB-1 die resistente. Ferner konnte gezeigt werden, dass Zelllinien, die sensitiv gegenüber Hitze sind, auch sensitiv gegenüber Bortezomib sind. Hingegen wies die als Bortezomib-resistent beschriebene Zelllinie NCEB-1 auch thermoresistente Eigenschaften auf.

Alle drei Mantelzelllymphomzelllinien exprimierten basale Level von Hsc70, Hsp70, Hsp27 und Hsp90. Im Detail exprimierte die thermo- und Bortezomib-resistente Zelllinie NCEB-1 deutlich mehr Hsp27 als die sensitiven Zelllinien (Abbildung 13a), wodurch die Hypothese aufgestellt wurde, ob die hohe basale Expression der Hsps die Zelle gegenüber Proteasomen-Inhibitoren und die dadurch induzierte Apoptose schützen kann. Shringapure *et al.* zeigte eine Korrelation zwischen der Expression von Hsp27, Hsp70 und Hsp90 und dem Bortezomib-resistenten Phänotyp in einer Genanalyse von B-Zelllymphomen ^[59].

In unseren Untersuchungen zeigte sich keine stärkere basale Expression von Hsp70 oder Hsp90, jedoch von Hsp27 in der resistenten Zelllinie NCEB-1, wodurch die Hypothese, die alleinig Hsp27 für die Resistenz gegenüber Proteasomen-Inhibitoren verantwortlich macht, unterstützt und bekräftigt wird ^[58, 59].

Tatsächlich führt die Blockade von Hsp27 zur Aufhebung der Bortezomib-Resistenz in Lymphomzellen, wo hingegen die ektopische Expression eines Wildtyp-Hsp27 ursprünglich sensitive Zellen resistent macht ^[58].

In vielen Krebsentitäten wurde bereits beobachtet, dass die Hsp-Expression dysreguliert ist und dadurch eine gesteigerte Expression vorliegt. Diese erhöhte Expression inhibiert zum einen den programmierten Zelltod (Hsp27, Hsp70) und unterstützt das autonome Wachstum (Hsp90) der Zelle, zum anderen führt die erhöhte Hsp-Expression zur Resistenzentwicklung der Krebszellen gegenüber Chemotherapie und Hyperthermie ^[50]. In diesem Zusammenhang wurden bereits verschiedene Substanzen entwickelt, die direkt die Hitzeschockantwort blockieren, indem sie Hsf-1 oder die Hsp mRNA Translation inhibieren. Dies führt zu einer starken Sensitivierung der Krebszellen gegenüber Proteasomeninhibitoren ^[61].

Wird Hsp90 durch Geldanamycin blockiert, führt dies darüber hinaus zu einer gegen Lymphome gerichteten Aktivität, indem der Abbau der Hsp90-client-Proteine durch das Proteasom gesteigert wird. Diese Krebszellen zeigen dadurch auch ein erhöhtes Ansprechen auf Bortezomib. Ein Schwerpunkt der Krebstherapie liegt folglich auf der potentiellen Steigerung der Resistenz gegenüber verschiedenen Medikamenten durch die Induktion der Hsps ^[73, 74].

In dieser Studie wurde beobachtet, dass Tumorzellen mit deutlich höherer Hsp27- und Hsp70-Produktion, welche nach Hitzeschock induziert werden, dadurch nicht resistenter gegenüber Bortezomib sind als Zellen, die basal ein geringes Level dieser Hsps aufzeigen. Tatsächlich korreliert die maximale Expression von Hsp27 und Hsp70, die nach 16 bis 24 Stunden der Hyperthermie-Anwendung nachweisbar ist, nicht mit einer gesteigerten Resistenz gegenüber Bortezomib in Jeko-1, Rec-1 und NCEB-1 (Abbildung 13, Tabelle 11). Dieser Effekt ist unabhängig von der thermalen Dosis, was zur Annahme führt, dass die Menge der induzierten Hsps, die nach hoher Thermaldosis deutlich höher als bei niedriger Thermaldosis liegt, nicht mit der Entstehung oder dem Grad der Resistenz in Zusammenhang steht. Diese Beobachtung ist mit bereits zuvor erhobenen Daten konsistent, die ebenfalls beschreiben, dass Tumorzellen mit höherer Hsp-Produktion nicht resistenter gegenüber Chemotherapie sind als jene mit niedriger basaler Expression ^[75]. Darüber hinaus widerlegt diese Beobachtung die Aussage, dass die Vorbehandlung der Zellen mit Hitzeschock zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber Proteasomeninhibitoren führt ^[61, 76]. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass im Unterschied zu thermotoleranten Zellen, in denen transient erhöhte Hitzeschockproteine frei zur Verfügung stehen und folglich mit neuen Substraten interagieren können, die Hitzeschockproteine in Tumorzellen in Chaperone-Komplexe eingebunden sind und somit nicht für die Zytoprotektion verfügbar sind ^[50].

Zusammenfassend konnten wir in unserer *in vitro* Studie beobachten, dass eine Vorbehandlung der Mantelzelllymphomzelllinien mit Hitze und die daraus resultierende hitzeinduzierte Überexpression der Hsps Hsp27 und Hsp70 nicht mit der Sensitivität dieser Zelllinien gegenüber Proteasomeninhibitoren interferiert.

Die Zellantwort auf Stress ist abhängig von der Stärke des Stress, die sich als Produkt aus Intensität und Dauer darstellt. Auch das Proteasom stellt einen Angriffspunkt für Hitze dar und die Beeinflussung seiner Aktivität korreliert mit der Stärke der Hitze.

In Übereinstimmung mit bereits zuvor erhobenen Daten ^[62, 77] berichtet Pajonk *et al.* über die Inhibition der Proteasomenaktivität durch eine höhere Thermaldosis (44 °C für 60 Minuten)

in Prostata-Krebs-Zellen, die letztlich in einer NF- κ B-Inhibition resultiert. Dies geschieht durch das Absenken des regulatorischen, thermosensitiven Anteils 19S im Proteasom [63]. Gegensätzlich hierzu wurde allerdings die Beobachtung gemacht, dass durch milden Hitzeschock die Level der Proteasome ansteigen [34].

Hyperthermie kann die Zytotoxizität vieler Chemotherapeutika beeinflussen [78]. Das Ausmaß der thermalen Chemosensibilisierung kann dadurch quantifiziert werden, dass das klonogene Zellwachstum und die Proliferationsaktivität *in vitro* oder die Inhibition des Tumorwachstums *in vivo* verglichen werden, nachdem die Zellen mit dem Medikament allein oder bei gleichzeitig erhöhter Temperatur behandelt werden. Die meisten alkylierenden Substanzen (z. B. Cyclophosphamid und Ifosfamid), Platin-Verbindungen und Nitro-Harnstoffe (z. B. BCNU und CCNU) werden in ihrer zytotoxischen Wirksamkeit durch Anhebung der Temperatur von 37 °C auf über 40 °C linear verstärkt und zeigen einen mehr als additiven Effekt. Im Gegensatz hierzu zeigen die meisten Antimetabolite (z. B. 5-Fluorodeoxyuridin oder Methotrexat) sowie Vincaalkaloide oder Taxane eine unabhängige Aktivität (additiv). Studien, welche sich mit dem zeitlichen Zusammenhang der Medikamenten-Hitze-Abfolge beschäftigten, zeigten, dass die Anwendung des Medikaments unmittelbar vor oder gleichzeitig zur Hyperthermie den stärksten Effekt hat. Die Interaktion zwischen Proteasomeninhibitoren und Hyperthermie wurde kürzlich in einem menschlichen Kolonkarzinommodell untersucht [79]. Chen *et al.* beobachteten einen signifikanten synergistischen Effekt bei Anwendung von Proteasomeninhibitoren unter hyperthermen Konditionen (43 °C für 60 Minuten) auf die Zellviabilität und zeigten, dass die gleichzeitige Kombination die Menge von Hsp27 vermindert, was letztlich zur thermalen Sensibilisierung und gesteigerten Apoptose führt [79]. Der wohl zugrunde liegende Mechanismus der Sensibilisierung auf Hitze und die Proteasomeninhibitoren durch die Verminderung von Hsp27 erscheint sinnvoll, da die Blockade von Hsp27 sowohl thermoresistente als auch chemoresistente Zellen auf Bortezomib sensibilisiert. Jedoch führen sowohl Hitzeschock als auch die Anwendung von Proteasomeninhibitoren zur Induktion der Hitzeschockantwort und somit zu einem transienten Anstieg induzierbarer Hsps [57, 80], so dass der beschriebene Mechanismus einer strengen zeitlichen Abhängigkeit unterliegen muss.

In unserem Versuch führte die gleichzeitige Anwendung von Hitze mit zwei verschiedenen thermalen Dosen und Bortezomib in steigenden Konzentrationen weder zu einer Aufhebung der Bortezomib-Resistenz in NCEB-1, die als einzige Zelllinie hohe basale Level von Hsp27 produziert, noch zu einem mehr als additiven Effekt (Synergismus) hinsichtlich des Zelltods

in Jeko-1 und Rec-1 durch Sensibilisierung der beiden Zelllinien. Diese Beobachtung war unabhängig von der applizierten thermalen Dosis.

In unserer *in vitro* Studie zeigte sich durch die gleichzeitige Anwendung von Hitze und Bortezomib lediglich ein additiver Zelltod (unabhängiger Vorgang) bei Bortezomib-Konzentrationen < 20 nM und bei thermalen Dosen, die über der Temperatur liegen, welche ein exponentiales Zellsterben verursacht (Abbildung 14). Darüber hinaus zeigt sich, dass die hitzeinduzierte Überexpression von Hsp27 nicht mit der Bortezomib-Sensitivität korreliert oder interagiert. Als mögliche Erklärung dieser unterschiedlichen Aussagen kann zum einen angeführt werden, dass NCEB-1 fünf bis acht stabile Mausechromosomen aufweist und sowohl humanes als auch murines Bcl-2-Protein exprimiert ^[71]. Man muss annehmen, dass die möglichen antiapoptotischen Gene unterschiedlich reguliert werden. Des Weiteren zeigen die Mantelzelllymphomzelllinien und die Kolonkarzinom-Zellen womöglich unterschiedliche Muster der basalen HSP-Expression sowie nach Hitzeschock. Auch unterschieden sich die Proteasomeninhibitoren in Produkt und Konzentration in beiden Systemen; wir verwendeten ansteigende Konzentrationen von Bortezomib im Bereich von 0-100 nM, welche auch die klinisch erreichbaren Konzentrationen widerspiegeln ^[81], während Chen *et al.* deutlich höhere Konzentration (10 µM) des Proteasomeninhibitors MG132 anwandten und somit ein unterschiedliches biologisches und pharmakologisches Verhalten wahrscheinlich ist ^[79].

Trotz der intrinsischen Einschränkung einer *in vitro* Studie zeigen diese Ergebnisse, dass die Anwendung von Bortezomib unter thermalen Konditionen durchaus vorteilhaft und erfolgversprechend sein kann und legitimiert dadurch eine weitere Vertiefung klinischer Untersuchungen.

Auch die Auswahl der Mantelzelllymphomzelllinien scheint als Modell für die Kombination der Hyperthermie- und Bortezomib-Anwendung gut geeignet zu sein, da die Zelllinien sowohl sensitiv gegenüber klinisch relevanten Bortezomib-Konzentrationen sind, durch Hitze (temperatur-abhängig) getötet werden können und letztlich die kombinierte Therapieanwendung einen additiven Effekt zeigt.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Untersuchung war es, den Einfluss von Hyperthermie auf die Sensitivität/Resistenz von Mantelzelllymphomzelllinien gegenüber Bortezomib in Abhängigkeit der Thermaldosis und des Zeitpunkts der Hyperthermie zu untersuchen.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden drei verschiedene Zelllinien (Jeko-1, Rec-1, NCEB-1) des Mantelzelllymphoms gewählt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde zunächst die unterschiedliche Sensitivität der einzelnen Zelllinien in Abhängigkeit der Bortezomibdosis bestätigt und die Zelllinien konnten anhand ihrer Sensitivität als stark sensitive (Jeko-1), intermediäre (Rec-1) und resistente (NCEB-1) Zelllinie beschrieben werden.

Im Anschluss wurden dann die zeit- und temperaturabhängigen Effekte der Hyperthermie auf die Mantelzelllymphomzelllinien untersucht. Hierbei wurden zwei verschiedene Hitzedosen (41,8 °C/120 Minuten und 44 °C/30 Minuten) gewählt, welche den sublethalen und lethalen Bereich und somit die Heterogenität der intratumoralen Hitzeverteilung während der Hyperthermieanwendung repräsentieren.

Hierbei zeichneten sich – abhängig von der angewandten Temperatur – unterschiedliche Überlebensmuster ab. Die Zelllinien, die sensitiv gegenüber Hitze waren, waren auch sensitiv gegenüber Bortezomib. Hingegen wies die als Bortezomib-resistent beschriebene Zelllinie NCEB-1 auch thermoresistente Eigenschaften auf.

Im Folgenden stand die zeitabhängige Expression von konstitutiven und induzierbaren Hitzeschockproteinen in den drei Mantelzelllymphomzelllinien im Fokus der Untersuchung. Anhand der Kinetik und Expressionsmuster erfolgte die Kombination von Hyperthermie und Bortezomib in zwei unterschiedlichen Sequenzen (gleichzeitige Anwendung vs. aufeinanderfolgende Anwendung mit 24-stündiger Inkubationszeit im Anschluss an die Hyperthermieanwendung und darauffolgende Bortezomibtherapie).

Es konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung der Zellen mit Hyperthermie und die dadurch induzierte Überexpression der Hitzeschockproteine nicht mit den Effekten von Bortezomib im Mantelzelllymphom interferiert und unabhängig von der Thermaldosis ist.

Ferner wies die gleichzeitige Kombination von Hyperthermie und Bortezomib einen additiven Effekt im Vergleich zu alleiniger Bortezomibanwendung auf, der besonders im Bereich klinisch relevanter Bortezomibdosen zum Tragen kommt.

In Zusammenschau der erhobenen Befunde stellt die Anwendung von Bortezomib unter thermalen Konditionen ein äußerst erfolgversprechendes und neues Konzept dar, um die

Therapiemöglichkeiten des Mantelzelllymphoms zu optimieren und legitimiert dadurch eine weitere Vertiefung klinischer Untersuchungen.

7 Literaturverzeichnis

1. Drexler, H.G. and R.A. MacLeod, *Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of mantle cell lymphoma*. Leuk Res, 2002. **26**(9): p. 781-7.
2. Dreyling, M., et al., [*Therapy of mantle cell lymphoma*]. Internist (Berl), 2007. **48**(4): p. 382-8.
3. Salaverria, I., et al., *Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives*. Haematologica, 2006. **91**(1): p. 11-6.
4. Goy, A., *New directions in the treatment of mantle cell lymphoma: an overview*. Clin Lymphoma Myeloma, 2006. **7 Suppl 1**: p. S24-32.
5. Bain, B.J. and D. Catovsky, *The leukaemic phase of non-Hodgkin's lymphoma*. J Clin Pathol, 1995. **48**(3): p. 189-93.
6. Fernandez, V., et al., *Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways*. J Clin Oncol, 2005. **23**(26): p. 6364-9.
7. Campo, E., M. Raffeld, and E.S. Jaffe, *Mantle-cell lymphoma*. Semin Hematol, 1999. **36**(2): p. 115-27.
8. Perez-Galan, P., et al., *The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status*. Blood, 2006. **107**(1): p. 257-64.
9. Marzec, M., et al., *Mantle cell lymphoma cells express predominantly cyclin D1a isoform and are highly sensitive to selective inhibition of CDK4 kinase activity*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1744-50.
10. Bosch, F., et al., *PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma*. Blood, 1994. **84**(8): p. 2726-32.
11. Aguilera, N.S., et al., *Differential expression of cyclin D1 in mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin's lymphomas*. Am J Pathol, 1998. **153**(6): p. 1969-76.
12. Argatoff, L.H., et al., *Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases*. Blood, 1997. **89**(6): p. 2067-78.
13. O'Connor, O.A., *Mantle cell lymphoma: identifying novel molecular targets in growth and survival pathways*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2007: p. 270-6.
14. Schaffner, C., et al., *Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2773-8.

15. Camacho, E., et al., *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*, 2002. **99**(1): p. 238-44.
16. Zhou, B.B. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*. *Nature*, 2000. **408**(6811): p. 433-9.
17. Pham, L.V., et al., *Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis*. *J Immunol*, 2003. **171**(1): p. 88-95.
18. Rudelius, M., et al., *Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma*. *Blood*, 2006. **108**(5): p. 1668-76.
19. LoPiccolo, J., et al., *Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations*. *Drug Resist Updat*, 2008. **11**(1-2): p. 32-50.
20. Zhou, Y., et al., *Immunotherapy in mantle cell lymphoma: anti-CD20-based therapy and beyond*. *Am J Hematol*, 2008. **83**(2): p. 144-9.
21. Witzig, T.E., *Current treatment approaches for mantle-cell lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(26): p. 6409-14.
22. Dreyling, M., Schmidt, C., Lenz, G., Unterhalt, M., Hiddemann, W., *Mantelzell-Lymphome*. *Manual Maligne Lymphome*. 2008: Tumorzentrum München; Zuckschwerdt Verlag München. 91-102.
23. Lenz, G., et al., *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*, 2005. **23**(9): p. 1984-92.
24. Howard, O.M., et al., *Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(5): p. 1288-94.
25. Forstpointner, R., et al., *Maintenance therapy with rituximab leads to a significant prolongation of response duration after salvage therapy with a combination of rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) in patients with recurring and refractory follicular and mantle cell lymphomas: Results of a prospective randomized study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG)*. *Blood*, 2006. **108**(13): p. 4003-8.

26. Lenz, G., M. Dreyling, and W. Hiddemann, *Mantle cell lymphoma: established therapeutic options and future directions*. *Ann Hematol*, 2004. **83**(2): p. 71-7.
27. Dreyling, M., et al., *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*, 2005. **105**(7): p. 2677-84.
28. Vandenberghe, E., et al., *Outcome of autologous transplantation for mantle cell lymphoma: a study by the European Blood and Bone Marrow Transplant and Autologous Blood and Marrow Transplant Registries*. *Br J Haematol*, 2003. **120**(5): p. 793-800.
29. Khouri, I.F., et al., *Allogeneic hematopoietic transplantation for mantle-cell lymphoma: molecular remissions and evidence of graft-versus-malignancy*. *Ann Oncol*, 1999. **10**(11): p. 1293-9.
30. Robinson, S.P., et al., *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*, 2002. **100**(13): p. 4310-6.
31. Kaufmann, H., et al., *Antitumor activity of rituximab plus thalidomide in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma*. *Blood*, 2004. **104**(8): p. 2269-71.
32. Dreyling, M., et al., *Mantelzell-Lymphome*. *MANUAL Maligne Lymphome*, Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München, 2008: p. 91-102.
33. Adams, J., *Development of the proteasome inhibitor PS-341*. *Oncologist*, 2002. **7**(1): p. 9-16.
34. Glickman, M.H. and D. Raveh, *Proteasome plasticity*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(15): p. 3214-23.
35. Mani, A. and E.P. Gelmann, *The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(21): p. 4776-89.
36. Pickart, C.M. and A.P. VanDemark, *Opening doors into the proteasome*. *Nat Struct Biol*, 2000. **7**(11): p. 999-1001.
37. Rajkumar, S.V., et al., *Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(3): p. 630-9.
38. Boccadoro, M., G. Morgan, and J. Cavenagh, *Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy*. *Cancer Cell Int*, 2005. **5**(1): p. 18.

39. Adams, J., et al., *Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents*. *Cancer Res*, 1999. **59**(11): p. 2615-22.
40. Goy, A., et al., *Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(4): p. 667-75.
41. Orłowski, R.Z., et al., *Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies*. *Blood*, 2005. **105**(8): p. 3058-65.
42. Fisher, R.I., et al., *Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(30): p. 4867-74.
43. Belch, A., et al., *A phase II study of bortezomib in mantle cell lymphoma: the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial IND.150*. *Ann Oncol*, 2007. **18**(1): p. 116-21.
44. O'Connor, O.A., et al., *Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(4): p. 676-84.
45. Hildebrandt, B., et al., *The cellular and molecular basis of hyperthermia*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002. **43**(1): p. 33-56.
46. Issels, R.D., *Hyperthermia adds to chemotherapy*. *Eur J Cancer*, 2008. **44**(17): p. 2546-54.
47. Schmoll, H.-J., Höffken, K., Possinger, K., *Kompendium Internistische Onkologie, Standards in Diagnostik und Therapie, Teil 1, Epidemiologie, Tumorbilogie, Zytostatika, Prinzipien der Tumortherapie, Supportive Maßnahmen*. 2006. p. 1090-1108.
48. Jolly, C. and R.I. Morimoto, *Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death*. *J Natl Cancer Inst*, 2000. **92**(19): p. 1564-72.
49. Ciocca, D.R. and S.K. Calderwood, *Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications*. *Cell Stress Chaperones*, 2005. **10**(2): p. 86-103.
50. Mosser, D.D. and R.I. Morimoto, *Molecular chaperones and the stress of oncogenesis*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2907-18.
51. Tang, D., et al., *Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo*. *Cell Stress Chaperones*, 2005. **10**(1): p. 46-58.

52. Bukau, B. and A.L. Horwich, *The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines*. Cell, 1998. **92**(3): p. 351-66.
53. Nollen, E.A. and R.I. Morimoto, *Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 14): p. 2809-16.
54. Esser, C., S. Alberti, and J. Hohfeld, *Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 171-88.
55. Valbuena, J.R., et al., *Expression of heat-shock protein-90 in non-Hodgkin's lymphomas*. Mod Pathol, 2005. **18**(10): p. 1343-9.
56. Kelley, W.L., *Molecular chaperones: How J domains turn on Hsp70s*. Curr Biol, 1999. **9**(8): p. R305-8.
57. Mitsiades, N., et al., *Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14374-9.
58. Chauhan, D., et al., *Blockade of Hsp27 overcomes Bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells*. Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6174-7.
59. Shringarpure, R., et al., *Gene expression analysis of B-lymphoma cells resistant and sensitive to bortezomib*. Br J Haematol, 2006. **134**(2): p. 145-56.
60. Ghobrial, I.M., et al., *Proteomic analysis of mantle-cell lymphoma by protein microarray*. Blood, 2005. **105**(9): p. 3722-30.
61. Zaarur, N., et al., *Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1783-91.
62. Kuckelkorn, U., et al., *The effect of heat shock on 20S/26S proteasomes*. Biol Chem, 2000. **381**(9-10): p. 1017-23.
63. Pajonk, F., A. van Ophoven, and W.H. McBride, *Hyperthermia-induced proteasome inhibition and loss of androgen receptor expression in human prostate cancer cells*. Cancer Res, 2005. **65**(11): p. 4836-43.
64. Falk, M.H. and R.D. Issels, *Hyperthermia in oncology*. Int J Hyperthermia, 2001. **17**(1): p. 1-18.
65. Hettinga, J.V., et al., *Mechanism of hyperthermic potentiation of cisplatin action in cisplatin-sensitive and -resistant tumour cells*. Br J Cancer, 1997. **75**(12): p. 1735-43.
66. Hettinga, J.V., A.W. Konings, and H.H. Kampinga, *Reduction of cellular cisplatin resistance by hyperthermia--a review*. Int J Hyperthermia, 1997. **13**(5): p. 439-57.

67. Issels, R.D., et al., *Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study*. Lancet Oncol, 2010.
68. van der Zee, J., et al., *Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial*. Dutch Deep Hyperthermia Group. Lancet, 2000. **355**(9210): p. 1119-25.
69. Overgaard, J., et al., *Randomised trial of hyperthermia as adjuvant to radiotherapy for recurrent or metastatic malignant melanoma*. European Society for Hyperthermic Oncology. Lancet, 1995. **345**(8949): p. 540-3.
70. Amin, H.M., et al., *Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines*. Arch Pathol Lab Med, 2003. **127**(4): p. 424-31.
71. Camps, J., et al., *Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines*. Leuk Res, 2006. **30**(8): p. 923-34.
72. Milani, V., et al., *Combination of hyperthermia and bortezomib results in additive killing in mantle cell lymphoma cells*. Int J Hyperthermia, 2009. **25**(4): p. 262-72.
73. Neckers, L. and K. Neckers, *Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents*. Expert Opin Emerg Drugs, 2002. **7**(2): p. 277-88.
74. Isaacs, J.S., W. Xu, and L. Neckers, *Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics*. Cancer Cell, 2003. **3**(3): p. 213-7.
75. Hettinga, J.V., et al., *Heat-shock protein expression in cisplatin-sensitive and -resistant human tumor cells*. Int J Cancer, 1996. **67**(6): p. 800-7.
76. Meriin, A.B., et al., *Protein-damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation: a novel pathway controlled by HSP72*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2547-55.
77. Mattson, D., et al., *Heat shock and the activation of AP-1 and inhibition of NF-kappa B DNA-binding activity: possible role of intracellular redox status*. Int J Hyperthermia, 2004. **20**(2): p. 224-33.
78. Kampinga, H.H., *Cell biological effects of hyperthermia alone or combined with radiation or drugs: a short introduction to newcomers in the field*. Int J Hyperthermia, 2006. **22**(3): p. 191-6.
79. Chen, F., et al., *Proteasome inhibition potentiates the cytotoxic effects of hyperthermia in HT-29 colon cancer cells through inhibition of heat shock protein 27*. Oncology, 2007. **73**(1-2): p. 98-103.

80. Welch, W.J. and J.P. Suhan, *Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress*. J Cell Biol, 1986. **103**(5): p. 2035-52.
81. Weigert, O., et al., *Sequence-dependent synergy of the proteasome inhibitor bortezomib and cytarabine in mantle cell lymphoma*. Leukemia, 2007. **21**(3): p. 524-8.