

Aus der Medizinische Klinik und Poliklinik III Großhadern
Klinik / Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**Rituximab Effektivität in Mantelzelllymphomen:
Additive und antagonistische Effekte mit
Standardchemotherapeutika und Molekularen
Substanzen**

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

vorgelegt von
Kristina Decheva

Aus Pazardzhik 2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. M. Dreyling

Mitberichterstatter: PD Irene Schmid

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2017

Inhalt

1. EINLEITUNG.....	5
1.1 Das Mantelzelllymphom	5
1.1.1 Definition und Epidemiologie.....	5
1.1.2 Morphologie und Immuntypisierung	5
1.1.3 Zytogenetik und Molekulargenetik	6
1.1.4 Klinik und Therapie	6
1.2 Rituximab	8
1.3 Chemotherapeutika.....	10
1.3.1 Fludarabin und Mitoxantron	10
1.4 Molekulare Substanzen	11
1.4.1 Bortezomib.....	11
1.4.2 Everolimus (Rad 001)	11
1.4.3 Flavopiridol.....	12
2 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	14
3 MATERIALEN UND METHODEN	15
3.1 Materialien.....	15
3.1.1 Zelllinien-Charakterisierung	15
3.1.2 Zytostatika und Inhibitoren.....	16
3.1.3 Lösungen und Puffer	16
3.1.4 Geräte	17
3.1.5 Softwares und EDV	17
3.2 Methoden.....	18
3.2.1 Zellkultur.....	18
3.2.2 Trypanblauzellzählungen mittels Vi-Cell:	18
3.2.3 Apoptose	19
3.2.4 Zellzyklusanalysen.....	20
4 ERGEBNISSE	23
4.1 Proliferationshemmung (Rituximab Monotherapie)	23

4.2	Komplementassoziierte Wachstumsinhibition von Rituximab	25
4.3	Rituximab und Zytostatika	26
4.3.1	Rituximab und Fludarabin (Proliferationshemmung)	26
4.3.1.1	Trypanblau-Analysen	26
4.3.1.2	Rituximab und Fludarabin (Apoptose)	28
4.3.2	Rituximab und Mitoxantron (Proliferationshemmung)	30
4.3.2.1	Trypanblau-Analysen	30
4.3.2.2	Rituximab und Mitoxantron (Apoptose)	31
4.4	Kombination von Rituximab mit molekularen Substanzen	32
4.4.1	Rituximab und Bortezomib (Proliferationshemmung)	32
4.4.1.1	Trypanblau-Analysen	32
4.4.1.2	Rituximab und Bortezomib (Apoptose)	34
4.4.2	Rituximab und Everolimus (Rad 001) (Proliferationshemmung)	35
4.4.2.1	Trypanblau-Analysen	35
4.4.2.2	Rituximab und Everolimus (Rad 001) (Apoptose)	37
4.4.2.3	Rituximab und Everolimus (Rad 001) (Zellzyklus)	38
4.4.3	Rituximab und Flavopiridol (Proliferationshemmung)	40
4.4.3.1	Trypanblau-Analysen	40
4.4.3.2	Rituximab und Flavopiridol (Apoptose)	41
4.4.3.3	Rituximab und Flavopiridol (Zellzyklus)	43
5	DISKUSSION	45
5.1	Rituximab	45
5.2	Rituximab und Zytostatika (Fludarabin oder Mitoxantron)	46
5.3	Rituximab und molekulare Substanzen	48
5.3.1	Rituximab und Bortezomib	48
5.3.2	Rituximab und Everolimus (Rad 001)	51
5.3.3	Rituximab und Flavopiridol	53
6	ZUSAMMENFASSUNG	56
7	ABKÜRZUNGEN	57
8	LITERATURVERZEICHNIS	61
9	DANKSAGUNG	71

1. EINLEITUNG

1.1 Das Mantelzelllymphom

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das Mantelzelllymphom gilt seit Einführung der REAL-Klassifikation und der auf ihr basierenden WHO-Klassifikation als eigenständige maligne Entität und ist charakterisiert durch die molekularbiologisch nachweisbare chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32), die zu einer Überexpression von Cyclin D1 führt (Jaffe, 2009, Bertoni et al., 2006, Morton et al., 2014). Es sind jedoch auch einige Cyclin D1-negativen Fällen beschrieben worden, die sich jedoch vom klinischen Verlauf her nicht unterscheiden (Fu et al., 2005, Jares et al., 2007, Zaja et al., 2014).

Die Erkrankung macht 6-8% aller malignen Lymphome aus und ist charakterisiert durch eine schlechte Prognose mit einem medianen Überleben von 3-4 Jahren und einem Langzeitüberleben von nur 10-15%. Die Inzidenz liegt bei 2/100 000 Einwohner pro Jahr, wobei Männer mit einem Verhältnis von 3-4:1 deutlich häufiger betroffen sind als Frauen. Der Altersmedian liegt bei 65 Jahren (Alinari et al., 2012, Dreyling et al., 2014b).

1.1.2 Morphologie und Immuntypisierung

Man unterscheidet zwei morphologischen Varianten des MCL- der klassische und der blastoide Typ (Dreyling et al., 2014b). Bei dem klassischen Typ sind die Zellen klein bis mittelgroß mit gekerbtem oder aber auch rundlichem Zellkern und unscheinbaren Nucleoli. Es ist durch eine monotone Proliferation und meist nodulären oder diffusen Wachstumsmuster charakterisiert. Die blastoide Variante zeichnet sich dagegen durch eine hohe Zellproliferation und einen klinisch rasch progredienten Verlauf aus (Jares et al., 2007, Dreyling, 2014a). Das morphologische Bild des blastoide Typs ist durch große, pleomorphe Zellen charakterisiert.

Immunhistologisch zeigen die MCL eine Expression von den Pan-B-Zellmarkern CD19+, CD20+, CD22+, CD24+, CD43+ und CD79a+, sowie eine Koexpression des T-Zell-Markers CD5+. Oft sind eine IgM- und eine IgD-Expression ebenso nachweisbar. Das MCL zeigt aber keine CD23-Expression, die für die CLL typisch ist (Williams and Densmore, 2005, Korz et al., 2002, Jares et al., 2007). Die Lymphomzellen sind auch für CD10 und BCL-6 negativ, was es von dem

follikulären Lymphom unterscheidet (Jares et al., 2007). Das typische Merkmal für das MCL ist aber die konstitutionelle Cyclin D1-Überexpression in der Immunhistochemie (Dreyling, 2014a).

1.1.3 Zytogenetik und Molekulargenetik

Man unterscheidet zwei zytologische Varianten des MCL: klassisches MCL und die blastoide Variante.

Das genetische Kennzeichen des MCL ist die Translokation t(11; 14) (q13; q32), die zu einer Kopplung des BCL-1-Gens von Chromosom 11 an den Promotor der schweren Immunglobulinrezeptorkette (IgH-Gen) auf Chromosom 14 führt. So kommt es zu einer Überexpression von Cyclin D1 (Dreyling, 2014a, Yatabe et al., 2000). Cyclin D1 ist ein wichtiger Zellzyklusregulator. Zusammen mit den Cyclin-abhängigen Kinasen CDK 4 und CDK6 führt Cyclin D1 zu einer Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRb). So treibt das phosphorylierte Retinoblastom-Protein über E2F-Transkriptionsfaktoren den Übergang des Zellzyklus von der G1- zur S-Phase (Jares et al., 2007, Perez-Galan et al., 2011). Auf diese Weise führt eine erhöhte Cyclin D1-Expression im MCL zu einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen.

Außer der oben erwähnten Störungen der Zellzyklusregulation kommt es bei MCL auch zu Störungen der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung. Eine häufige genetische Alteration ist die Deletion des *ATM*-Gens, der nach DNA-Schädigung zahlreiche Schlüsselproteine, wie p53, CHK2, BRCA1 und MDM2 aktiviert (Zhou and Elledge, 2000).

Eine gesteigerte Proliferation und verminderte Apoptose werden bei MCL auch durch anderen Mechanismen wie z.B. Überexpression von Transkriptionsfaktor NF-κB oder über die Aktivierung des PI3 Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges verursacht (Pham et al., 2003, Rudelius et al., 2006, Perez-Galan et al., 2011).

1.1.4 Klinik und Therapie

Obwohl in den letzten Jahren vieles über die Pathomechanismen des MCL geklärt wurde, ist diese Erkrankung schwer zu therapieren.

Die meisten Patienten werden erst im Ann-Arbor-Stadium III oder IV diagnostiziert, die sich mit generalisierten Adenopathie bzw. mit Knochenmarkinfiltration manifestieren (Perez-Galan et al., 2011, McKay et al., 2012, Zaja et al., 2014). Häufig findet sich auch ein extranodaler Befall. Betroffene Organe können Leber, Milz, Lunge, gastroenteristinaler Trakt oder Waldeyer'scher

Rachenring sein (Jares et al., 2007, Alinari et al., 2012). Eine Leukozytose kann ebenso vorkommen. B-Symptomatik mit Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust ist nicht immer zu beobachten. Prognostisch ungünstige Faktoren für das Überleben sind neben den fortgeschrittenen Stadium (Ann-Arbor-Stadium III oder IV), auch Alter, ein schlechter Allgemeinzustand, Splenomegalie und Anämie. Zur Abschätzung des Risiko-Profiles des MCL ist ein Mantelzell-Lymphom-spezifischer Risiko-Score (MIPI) etabliert, der das fortgeschrittene Patientenalter, einen reduzierten Allgemeinzustand und die Erhöhung der Leukozytenzahl oder LDH einschließt (Hoster et al., 2008, Zaja et al., 2014, Dreyling et al., 2014b). Zum anderen ist die Bestimmung des Ki67-Färbeindex ganz wichtig für die Risikoabschätzung (Dreyling, 2014a, Dreyling et al., 2014b). Dabei korreliert der Prozentsatz von Ki67-positiven Tumorzellen in den Gewebeproben mit der Cyclin D1-Expression und ist charakteristisch für die aggressiven MCL-Subtypen, wie z. B. die blastoide Variante des MCL (Klapper et al., 2009). Der Transkriptionsfaktor SOX 11 ist auch mit der Aggressivität der Erkrankung assoziiert. Ein Fehlen von SOX 11 ist dagegen mit einem indolenten Verlauf des MCL verbunden (Dreyling et al., 2014b, Perez-Galan et al., 2011, Jares et al., 2012).

Bei asymptomatischen Patienten mit niedrigem MIPI kann man ein abwartendes Verhalten diskutieren. Erst wenn die Patienten symptomatisch werden, was einige Monate oder Jahre dauern kann, sollte man als Therapie der ersten Wahl R-CHOP oder R-Bendamustin wählen (Vose, 2012).

Die aktuelle primäre Standardtherapie bei MCL ist die Kombination der konventionellen Chemotherapie CHOP mit dem CD20-Antikörper Rituximab. Eine Phase-II-Studie zeigte bei dieser Kombination ein Ansprechen von 96%, wobei das progressionsfreie Überleben nur bei 17 Monaten lag (Howard et al., 2002). Bei jungen Patienten (< 65 Jahre) folgt nach dem R-CHOP-Regime eine autologe Stammzelltransplantation (SZT) und bei älteren Patienten (>65 Jahre) eine Rituximab-Erhaltungstherapie (Dreyling et al., 2014b, Dreyling, 2014a, Maddocks and Blum, 2015).

Alternativ wird bei der primären Therapie bei jüngeren Patienten das R-DHAP-Regime, bei älteren die BR-Therapie eingesetzt. Delarue et al. zeigt, dass R-DHAP gefolgt von einer Stammzelltransplantation eine effektive Therapieoption für jüngere MCL-Patienten darstellt (Delarue et al., 2013). Rummel et al. zeigten, dass bei Patienten mit primär unbehandelten indolenten MCL das BR-Regime sogar besser als R-CHOP Regime wirkt und wesentlich besser verträglich ist (Rummel et al., 2013). In einer Phase-III-Studie wurde die Ansprechrate zwischen R-CHOP und R-FC-Regime verglichen (Kluin-Nelemans et al., 2012). Die Fludarabin Kombination zeigte ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben (47 Mo. vs. 62 Mo.). Deshalb wird diese Regime in der primären Therapie von MCL nicht mehr empfohlen.

Die aktuelle Empfehlung beim ersten Rezidiv bei jüngeren Patienten ist die Immunchemotherapie mit z.B. BR oder DHAP-Regime ggf. gefolgt von einer allogenen SZT. Bei älteren Patienten wird ebenso BR, R-FC oder andere molekulare Ansätze ggf. allogener SZT oder Radioimmuntherapie empfohlen.

Bei höherem Rezidiv kommen molekulare Ansätze wie z.B. Temsirolimus, Lenalidomid, Bortezomib und Ibrutinib in Frage. Bortezomib hat in mehreren Studien bei den rezidierten MCL Ansprechraten von ca. 40% gezeigt (Goy et al., 2009). In einer kleinen Phase-II-Studie, bei der die Kombination von Bortezomib mit R-CHOP untersucht wurde, kam es zu einer Ansprechrate von 81% und einem progressionsfreien Überleben von 44% nach zwei Jahren (Friedberg et al., 2011). Robrak et al. zeigte vielversprechende Ergebnisse bei der Therapie von neudiagnostizierten MCL, indem Vincristin in der Standardchemotherapie R-CHOP durch Bortezomib ersetzt wird (Robak et al., 2015). Eine Übersicht der Therapieansätze bei der Behandlung von MCL wurde im Review von Avivi und Goy gegeben (Avivi and Goy, 2015).

1.2 Rituximab

Rituximab ist ein biotechnologisch hergestellter monoklonaler, chimärer Antikörper. Der Antikörper ist ein IgG1-kappa-Immunglobulin mit variabler Region aus murinen leichten und schweren Sequenzen und konstanter humaner DNA. Rituximab ist spezifisch gegen das B-Zell-Antigen CD20 gerichtet. Das Transmembran-Antigen CD20 ist ein nicht glykosyliertes Phosphoprotein, das auf prä-B- und reifen B-Lymphozyten exprimiert wird, nicht jedoch auf hämatopoetischen Stammzellen, frühen Vorläuferzellen der B-Zellen und normalen Plasma-Zellen oder anderem normalen Gewebe. Das CD20 Antigen ist auf mehr als 95% aller Zellen von B-Non-Hodgkin-Lymphomen zu finden.

Rituximab besitzt unterschiedliche Wirkmechanismen. Zum einen induziert Rituximab direkt Apoptose in den Zellen. Der monoklonale Antikörper bewirkt nach seiner Bindung an den CD20-Rezeptor eine Translokation von CD20 in cholesterinreiche Mikrodomänen der Zellmembran, die lipid rafts. Daraufhin folgt eine Modulation der intrazellulären Signalwege von PI3K, NF- κ B, MAPK, ERK1/2 und p38. Dadurch kommt es zu programmiertem Zelltod, sowie zur Chemosensibilisierung der B-NHL (Bonavida, 2007, Janas et al., 2005, Jazirehi et al., 2003, Jazirehi et al., 2007, Suzuki et al., 2007, Vega et al., 2004), (Heinrich et al., 2015).

Weitere Wirkmechanismen von Rituximab sind die komplementabhängige Zellyse (CDC,

complement-dependent cytotoxicity) und die antikörperabhängige, zellvermittelte Lyse der Zielzelle (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). Dank der humanen Fc-Region von Rituximab ist eine effektive Aktivierung des menschlichen Immunsystems möglich. Rituximab bindet humanes C1q und ist so in der Lage Komplement-vermittelte Lyse zu induzieren. Bei der ADCC können Immuneffektorzellen, wie z.B. NK-Zellen oder Makrophagen den Fc-Teil des gebundenen Antikörpers mittels ihres Fc-Rezeptors erkennen und so die „sichtbar“ gemachte Zielzelle lysieren (Cragg and Glennie, 2004, Golay et al., 2006).

Rituximab wurde in die klinische Praxis im Jahr 1997 eingeführt. Das Medikament wurde ursprünglich von der US FDA und der Europäischen Arzneimittelagentur für rezidierte oder refraktäre folliculäre CD20+ B-Zell-Lymphomen zugelassen. Anschließend wurde seine Verwendung erweitert und schließt Erstlinien-Therapie in folliculären Lymphomen sowie die Behandlung aggressiver Subtypen wie den diffusen grosszelligen B-Zell-Lymphomen ein. In den meisten Studien zeigte sich Rituximab als eine gut verträgliche Substanz mit moderaten und reversiblen Nebenwirkungen. Bei Erstgaben traten Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit, Erbrechen, Rhinitis, Kopfschmerzen auf. Sehr selten wurde über schwerwiegende Symptome wie Bronchospasmus oder Hypotension berichtet.

Die Ergebnisse von randomisierten Phase III-Studien zeigten den Vorteil der Kombination von Rituximab mit Chemotherapie-Schemata wie CVP, CHOP, MCP und CHVP- α IFN bei Patienten mit neu diagnostizierten MCL und folliculären NHL mit einer erhöhten Ansprechrate und verlängertem progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben (Lenz et al., 2005, Marcus et al., 2010, Hiddemann et al., 2005, Herold et al., 2007, Salles et al., 2008). Bei Patienten mit rezidivierenden oder refraktären folliculären Lymphomen und MCL wurde eine höhere Ansprechrate und eine verlängerte Zeit bis zur Krankheitsprogression bei der Kombinationen von Rituximab mit CHOP oder FCM gezeigt (van Oers et al., 2006, Forstpointner et al., 2004). Andere Studien beweisen, dass eine Erhaltungstherapie mit Rituximab bei FL die Dauer des Ansprechens und die Zeit bis zur Krankheitsprogression verlängern kann (Ghielmini et al., 2004, Hainsworth et al., 2005, Hochster et al., 2009, van Oers et al., 2006). Le Gouill et al., zeigten, dass eine Erhaltungstherapie mit Rituximab nach Hochdosischemotherapie und autologer Stammzelltransplantation das ereignisfreie Überleben bei Patienten mit MCL-Lymphomen verlängern kann (Le Gouill and Thieblemont, 2014).

1.3 Chemotherapeutika

1.3.1 Fludarabin und Mitoxantron

Fludarabin gehört zur Gruppe der Purin-Analoga und ist ein fluoriertes Nukleotid-Analogon, das als ein effektives Chemotherapeutikum in der Behandlung von Leukämien und Lymphomen benutzt wird. Es enthält die β -D-Arabinofuranose an Stelle der β -D-Ribofuranose und das Adenin ist an der 2-Stelle mit Fluor substituiert. Das aktive Metabolit ist Fludarabin-ATP, das die DNA-Synthese durch Hemmung der Ribonukleotidreduktase und der DNA-Polymerase verhindert. Das Fludarabin-Nukleotid wird als falscher Baustein in die DNA eingebaut und führt damit zur Apoptose der Zelle. Die Hauptnebenwirkungen von Fludarabin sind eine ausgeprägte Myelosuppression in allen drei Zellreihen und Immunsuppression, die mit einer erhöhten Infektanfälligkeit assoziiert ist.

Mitoxantron ist ein zytotoxisches Antibiotikum der Gruppe der Anthracendione, das sich der DNA durch Interkalation anlagert, was Strangbrüche der DNA verursacht. Außerdem behindert Mitoxantron RNA und hemmt die Topoisomerase II, welche für die Entspiralisierung und Reparatur beschädigter DNA verantwortlich ist. Diese Prozesse passieren im Gegensatz zu Fludarabin unabhängig vom Zellzyklus. Mitoxantron wird als Zytostatikum bei AML, Mammakarzinom, Prostatakarzinom, NHL und als Immunsuppressivum bei der Multiplen Sklerose eingesetzt. Die häufigsten Nebenwirkungen bei Mitoxantron sind Übelkeit, Erbrechen, Haarausfall, Appetitlosigkeit, Kardiotoxizität und Knochenmarktoxizität mit Anämie, Thrombozytopenie, Leukopenie und darauffolgender Infektanfälligkeit.

Bei der Therapie von MCL zeigten Fludarabin und Mitoxantron eine signifikante Aktivität. Beide Substanzen wurden in MCL in dem Therapieschema FCM kombiniert, deren Effektivität bei simultaner Anwendung von Rituximab deutlich verbessern werden konnte (Forstpointner et al., 2004).

Die Kombination von Fludarabin, Cyclophosphamid und Rituximab ist die primäre Standard-Therapie bei CLL. Als effektive Chemotherapie bei rezidivierender und refraktärer CLL hat sich die Kombination von Fludarabin, Mitoxantron, Cyclophosphamid und Rituximab, das s. g. R-FCM, erwiesen (Hillmen et al., 2011). Die Effektivität von Fludarabin-basierter Chemotherapie in Kombination mit Rituximab wurde auch bei der Behandlung von anderen indolenten Non-Hodgkin Lymphomen und rezidivierender Haarzelleukämie gezeigt (Fabbri et al., 2013, Zinzani et al., 2013, Gerrie et al., 2012).

1.4 Molekulare Substanzen

1.4.1 Bortezomib

Bortezomib ist ein Proteasom-Inhibitor, der das Proteasom 26S reversibel inhibiert, welches für den Abbau von intrazellulären Proteinen, wie z.B. p53, NF- κ B-Inhibitor und CDK-Inhibitor essentiell ist. Das führt zu einem Zellzyklusarrest und Apoptose bei Dysbalance zwischen pro- und antiapoptotischen Signalen (Adams, 2004). Durch Blockierung der Stoffwechselwege der Krebszellen kommt es zur Hemmung des Tumorwachstums, Hemmung der Angiogenese und Apoptose.

In präklinischen Studien erzielt Bortezomib eine Sensibilisierung der Tumorzellen auf Chemo- und Strahlentherapie (Pham et al., 2003, Wang et al., 2008). In der EU ist Bortezomib in Kombination mit Melphalan und Prednisolon zur Behandlung von Patienten mit unbehandeltem multiplen Myelom, die für Hochdosis-Chemotherapie nicht geeignet sind, und zur Monotherapie bei Patienten, die mindestens eine vorangehende Therapie durchlaufen haben, zugelassen. Bortezomib wird in klinischen Studien auch für die Behandlung anderer Non-Hodgkin-Lymphomen getestet. In verschiedenen Studien wurden unterschiedliche Applikationsschemata in indolenten und aggressiven NHLs geprüft. (Gerecitano et al., 2009, Dunleavy et al., 2009, Ribrag et al., 2009). Das Medikament wurde auch in MCL als Monotherapie, aber auch in Kombination mit verschiedenen Chemotherapie-Schemata getestet (Goy et al., 2009, Ruan et al., 2011, Friedberg et al., 2011, Baiocchi et al., 2011, Furtado et al., 2015, Robak et al., 2015).

Die wichtigste Nebenwirkung bei der Behandlung mit Bortezomib ist die periphere Neuropathie. Sie ist therapeutisch nur schwer beeinflussbar und kann bis zu 70% der behandelten Patienten betreffen und sie stark beeinträchtigen. In der Regel kann sich die Neuropathie wieder zurückbilden (Richardson et al., 2006). Seltener Nebenwirkungen von Bortezomib sind Knochenmarktoxizität, Übelkeit, Durchfall und Fatigue.

1.4.2 Everolimus (Rad 001)

Mammalian Target of Rapamycin mTOR ist eine Serin-/Treonin-Kinase, die mehrere Proteine und Enzyme phosphoryliert und aktiviert (Tsang et al., 2007, Thomson et al., 2009). mTOR enthält zwei Multiproteinkomplexe, mTORC1 und mTORC2, die parallel unterschiedliche Signalwege regulieren (Chiang and Abraham, 2007, Thomson et al., 2009). mTORC1 fördert die Synthese von Proteinen, welche das Überschreiten des G1-Kontrollpunktes des Zellzyklus regulieren (Panwalkar

et al., 2004, Peponi et al., 2006). mTORC2 aktiviert die onkologische Kinase Akt und steuert das Zellwachstum, die Zellproliferation und beteiligt sich an Zytoskelettorganisation (Chiang and Abraham, 2007).

Everolimus (Rad 001) ist ein Abkömmling des Rapamycins, einem mTOR-Inhibitor, und hemmt die Tumor-Zellproliferation (Dancey, 2006, Hess et al., 2009). mTOR-Inhibitoren verhindern die Aktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und beschleunigen den Umsatz von Cyclin D1 (Sabatini, 2006, Alao, 2007), sodass es zu einem G1-Phase-Arrest kommt (Chiang and Abraham, 2007). Die Hauptnebenwirkungen von Everolimus (Rad 001) sind Anämie, Thrombozytopenie, Leukopenie und daraus resultierende Infektionen, sowie Hyperlipidämie, Hautreaktionen und Mucositis. Weitere häufige unerwünschte Wirkungen sind Pneumonitis, Pleura- und Perikardergüsse, Leberwerterhöhung und Wundheilungsstörungen (Tsang et al., 2007, Dancey, 2006, Nashan and Citterio, 2012). Everolimus (Rad 001) findet derzeit Anwendung bei der Therapie des Nierenzellkarzinoms (Battelli and Cho, 2011). Darüber hinaus wird es in Studien in malignen Lymphomen (Argyriou et al., 2012, Witzig et al., 2011) und auch MCL (Renner et al., 2012), bei subependymalen Riesenzellastrozytom (Turner et al., 2011), neuroendokrinen Pankreastumoren (Kulke et al., 2011), Brustkrebs (Morrow et al., 2011), Magenkarzinom (Lim et al., 2011) und hepatozellulärem Karzinom (Zhu et al., 2011) geprüft.

1.4.3 Flavopiridol

Flavopiridol inhibiert Cyclin-abhängigen Kinasen wie CDK4 und vermindert die Expression von Cyclin D1 und Cyclin D3, was zu einem G1-Block in den normalen Zellen führt, sowie Apoptose und Zellzyklusblock in Leukämie- und Lymphomzellen induziert (Carlson et al., 1999, Sausville et al., 2000). Venkataraman et al. zeigten die Induktion einer signifikanten Apoptose bei der MCL-Zelllinie Jeko-1, indem Flavopiridol Cyclin D1 herunterreguliert (Venkataraman et al., 2006). In dieser Studie beobachtete man auch eine Herunterregulation von pRb durch Flavopiridol. Rb wird durch den Cyclin D1/ CDK4/6 Komplex zu p-Rb phosphoryliert. pRb führt zu Freisetzung des E2F-Transkriptionsfaktors, der die Zellen in die S-Phase treibt (Massague, 2004). Außerdem reguliert Flavopiridol antiapoptotische Proteine wie Mcl-1 herunter, was wiederum zu einer Resistenz auf Rituximab und Fludarabin führt (Kitada et al., 2000).

Die Resultate in den ersten klinischen Studien waren enttäuschend, da die getesteten Applikationsschemata von den Daten aus in vitro Studien übernommen wurden, in denen Kälberserum benutzt wurde. Die Bindungsrate von Flavopiridol im Kälberserum ist jedoch niedriger als im humanen Serum (Byrd et al., 1998). In späteren Phase I- und II-Studien mit 116

EINLEITUNG

Patienten mit rezidivierter oder refraktärer CLL wurde das Applikationsschemata angepasst und ein Ansprechen um 40% beziehungsweise 53% beobachtet (Lin et al., 2009, Phelps et al., 2009).

Die hämatotoxischen Nebenwirkungen von Flavopiridol sind moderat. Die wichtigsten unerwünschten Wirkungen sind das Tumorlysesyndrom, Diarrhoe und Übelkeit (Byrd et al., 2007).

2 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Das Mantelzelllymphom gilt als nicht kurabel und ist charakterisiert durch frühzeitige Rezidive und ein kurzes medianes Gesamtüberleben. Nach der Einführung von Rituximab konnte die Prognose des MCL deutlich verbessert werden. Um die Therapie von MCL weiter zu verbessern, ist es wichtig die Aktivität von neuen Substanzen zu prüfen und zu kennen.

Ziel dieser Arbeit ist die direkte und die komplement-induzierte Wirkung von Rituximab auf etablierte MCL-Zelllinien zu charakterisieren und seine Interaktion mit einzelnen Standardchemotherapeutika, sowie neuen molekularen Substanzen im Einzelnen zu überprüfen.

Insbesondere wurde untersucht, welche Substanzen und deren Kombinationstherapie mit Rituximab additive, synergistische oder antagonistische Effekte induzieren. In den Folgeexperimenten wurden diese Effekte in den Apoptose- und Zellzyklusanalysen näher charakterisiert.

3 MATERIALEN UND METODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Zelllinien-Charakterisierung

In der Arbeit wurden etablierte humane MCL-Zelllinien verwendet (s. Tabelle 1). Die Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Rec-1 wurden über die Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)(Braunschweig, Deutschland) und die Zelllinie Z-138 über die Amerikan Type Culture Kollektion (ATCC)-LGC Promochem GmbH (Wesel, Deutschland) bezogen. Als Kontrolle wurde die β -ALL Zelllinie BALL-1 verwendet.

Die Tabelle 1 stellt die Charakteristika der MCL-Zelllinien zusammen.

Charakterisierung	Granta-519	Rec-1	Jeko-1	Z 138
Patientenalter	58	61	78	70
Patientengeschlecht	w	m	w	m
Entnahmeort	PB	LK	PB	BM
Verdopplungszeit	49h	20-40h	50h	18-24h
Nachweis der t(11;14)(q13;q32)	+	+	+	+
Cyclin D1 Protein-Expression	+	++	+	++
CD 20	+	+	+	+
CD 10	-	-	-	-
CD 23	+	n.a.	-	-
P16	-	n.a.	+	-
RB	+	n.a.	+	n.a.
Bcl-2	+	n.a.	+	-
BAX	+	n.a.	+	n.a.
EBV	+	n.a.	-	-

Tabelle 1: Charakterisierung der MCL-Zelllinien nach Drexler et al. 2000, 2002, 2006; nach Amin et al. 2003; nach Rudolph et al. 2004 und nach Campo et al. 20006. Abkürzungen: w- weiblich, m-männlich, PB- peripheres Blut, LK- Lymphknoten, n.a.- not available.

3.1.2 Zytostatika und Inhibitoren

<u>Therapeutikum</u>	<u>Konzentration in vitro</u>	<u>Hersteller</u>
Mitoxantron	0,5 µg/ml	Sandoz Pharmaceuticals GmbH (Holzkirchen, D)
Fludarabin	0,25 µg/ml	Actavis GmbH & Co.KG (München, D)
Rituximab	12 µg/ml	Roche Pharma AG (Grenzach-Wyhlen, D)
Rad001	100 nM	Novartis (Basel, Schweiz)
Flavopiridol	100 nM	Sanofi Aventis (Vitry sur Seine, FR)
Bortezomib	5 nM	Millenium (Cambridge, MA, USA)

Kommerzielle Kits

Annexin V-FITC	BD Pharmingen (Heidelberg, D)
Annexin Binding Buffer	BD Pharmingen (Heidelberg, D)
Propidium Iodide Staining Solution	BD Pharmingen (Heidelberg, D)
Trypanblau (0,4%), T8154	Sigma- Aldrich GmbH (Taufkirchen, D)

3.1.3 Lösungen und Puffer

DPBS	Pan-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
FKS	Pan-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
Humanes Serum BG AB	Institut für Transfusionsmedizin GmbH (Suhl, Deutschland)
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Pan-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
RNA-se	QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)

MATERIALEN UND METHODEN

Lysis-Puffer für PI Färbung	2mg Propidiumiodid
	100mg Natriuncitrat
	100 µl Triton X-100
	100 ml Aqua purificata
	pH 8.0 mit HCL

3.1.4 Geräte

Begasungsbrutschrank	W. C. Heraeus GmbH Hanau, Deutschland
Zentrifuge 5415D	Hettich Zentrifugen Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge Rotanta 46RC	Hettich Zentrifugen Eppendorf, Deutschland
Durchflußzytometer	BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA BD FACS Calibur
Mikroskop	Carl Zeiss Jena, Deutschland
Lichtmikroskop	Opto Sonderbedarf GmbH München, Deutschland

3.1.5 Softwaren und EDV

CalcuSynt 2.0	Biosoft (Cambridge, UK)
Cellquest	Becton Dickinson (Mountain View, CA, USA)
EndNote®X6	Thompson ISI Researchsoft (Carlsbad, CA, USA)
FlowJo	Tree Star Inc., San. Carlos, CA, USA
MS-Office 2010	Microsoft (Redmond, WA, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) kultiviert, die im Begasungsbrutschrank bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und CO₂-Gehalt von 5% gehalten wurden. Die Zelllinien BALL-1 und Z-138 wurden in einem RPMI-1640 Medium kultiviert, das mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) versetzt wurde. Die restlichen Zelllinien (Granta-519, Jeko-1 und Rec1) wurden im RPMI-1640 Medium mit 20% FKS kultiviert. Bevor das Serum zum RPMI-1640 Medium zugesetzt wurde, wurde es bei 56°C für 45 min. im Wasserbad inaktiviert, sodass die hitzeempfindlichen Komponenten des Komplementsystems im Kälberserum zerstört wurden.

Alle Zelllinien wurden dreimal in der Woche gesplittet. Dabei wurde ein Teil von der Zellsuspension verworfen und mit frischem Medium ersetzt, sodass die Zelldichte ca. $0,5 \times 10^6$ betrug. Vor Verwendung wurde das Medium auf 36°C erwärmt.

Alle Experimente wurden unter sterilen Bedingungen in Sterilgutwerkbänken durchgeführt. Der gesamte Arbeitsbereich wurde durch eine UV-Lampe sterilisiert. Jedes Experiment wurde bei vertikalem Luftstrom durchgeführt, um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden.

3.2.2 Trypanblauzellzählungen mittels Vi-Cell:

Trypanblau ist ein polyanionischer Farbstoff, der durch die Zellmembran in die Zellen eindringt. Die Substanz wird von den lebenden Zellen wieder herausgepumpt. Sie erscheinen farblos. Apoptotische Zellen werden dagegen blau angefärbt. So können vitale und gestorbene Zellen unterschieden werden.

Diese Analysen wurden mittels eines Messgeräts von Beckman Coulter Vi-Cell™ durchgeführt. Dabei wird 1ml Probenmenge aspiriert und mit Trypanblau gemischt. Das Aspirat wird durch ein Durchfluss-Zytometer gepumpt und 100 Standbilder werden gemacht. Die Software analysiert die Leuchtdichte der Zellen. Dabei wird eine Leuchtdichte von 0 (schwarz) bis 255 (weiß) errechnet. Zellen, die apoptotisch sind, haben Trypanblau aufgenommen und weisen eine niedrige Leuchtdichte auf. Zellen, die dagegen vital sind, haben eine hohe Leuchtdichte. Alle Zelllinien wurden mit "Default"-Einstellung analysiert.

Versuchdurchführung:

Die MCL-Zelllinien wurden auf einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ / ml eingestellt und bei 37°C mit

Rituximab und den einzelnen Kombinationssubstanzen inkubiert. Jede Flasche enthielt 5 ml Zellsuspension. Dabei wurden Rituximab als Einzelsubstanz oder in Kombination mit dem entsprechenden zytostatischen oder molekularen Substanz bzw. das Kombinationsmedikament als Einzelsubstanz angesetzt. Jeder Versuch wurde in dreifachem Ansatz durchgeführt. Die Auswertungen fanden nach 24, 48 und 72 Stunden statt und die Ergebnisse wurden mittels der Fraction of Product Formel berechnet.

Fraction of Product

Um mögliche synergistische oder antagonistische Effekte zwischen Rituximab und seinen Kombinationspartnern zu ermitteln, wurde die Formel nach Webb verwendet (Webb et al., 1963). Dabei wird die relative Zellzahlveränderung der behandelten Proben mit dem jeweiligen Tageswert der unbehandelten Kontrolle verglichen und in Prozent errechnet (fraction affected= FA).

$$(1-FA \text{ Medikament A}) \times (1-FA \text{ Medikament B}) - (1-FA \text{ Kombination Medikament A+B})$$

Danach wurden der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Hierbei wurden Fraction of product Werte $>+0.1$ als synergistisch und Werte < -0.1 als antagonistisch bewertet. Werte zwischen beiden Punkten wurden als Kombinationen mit unabhängigem Effekt der Einzelsubstanzen als additiv bewertet.

3.2.3 Apoptose

Annexin V-FITC wird zur quantitativen Bestimmung des Prozentsatzes der apoptotischen Zellen verwendet. Es beruht auf der Eigenschaft von Zellen die Membran-Asymmetrie in den frühen Phasen der Apoptose zu verlieren. In apoptotischen Zellen ist das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren Seite der Plasmamembran zu der äußeren Seite transloziert. Annexin V ist ein Ca^{2+} Phospholipid-abhängigen-bindendes Protein, das eine hohe Affinität für PS hat, somit können apoptotische Zellen mit PS angefärbt werden. Propidiumiodid (PI) wird verwendet, um früh- und spätapoptotische von vitalen Zellen zu unterscheiden. PI kann die Zellmembran vitaler Zellen dagegen nicht durchdringen, während die Membranen von toten und geschädigten Zellen für PI durchlässig sind.

Zellen, die für Annexin V-FITC positiv und PI negativ sind, befinden sich in der frühen Apoptose. Zellen, die sowohl für Annexin V-FITC als auch für PI positiv sind, befinden sich im Endstadium der Apoptose oder sind nekrotisch. Die Zellen, die sowohl für Annexin V-FITC als auch für PI negativ sind, sind vital (Abb.1).

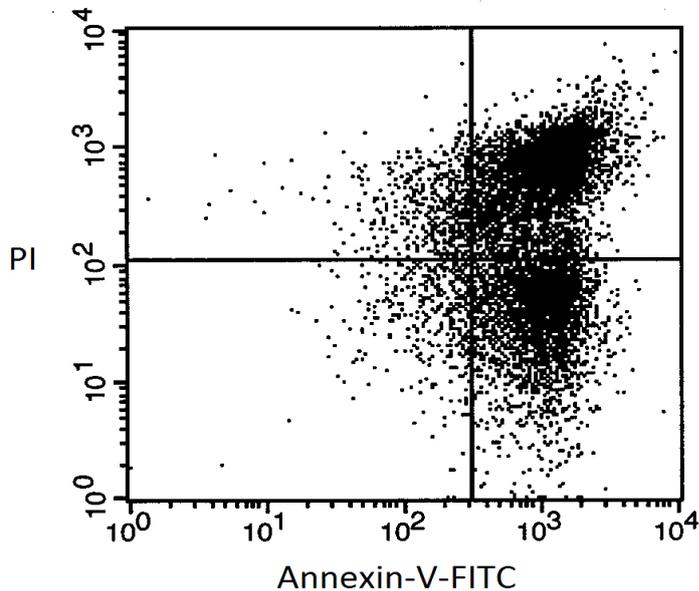


Abb.1 zeigt die Apoptose bei der Zelllinie BALL-1 nach Behandlung mit Rituximab und Bortezomib. In dem linken unteren Quadrant sind die vitalen Zellen dargestellt (4,21%), in dem rechten unteren Quadrant- die frühapoptotischen Zellen (32,6%), in dem rechten oberen Quadrant- die spätapoptotischen Zellen (57,35%). Links oben befinden sich die Zelltrümmer (5,84%). PI-Propidiumiodid

Versuchdurchführung:

Die Zelllinien wurden auf einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ / ml eingestellt und wurden bei 37°C mit Rituximab und mit den einzelnen Kombinationssubstanzen inkubiert. Nach 72h wurde je 1ml Zellsuspension in FACS-Röhrchen pipettiert und zweimal mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurden je 5µl Annexin V-FITC und Propidiumiodid zugegeben, die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 400 µl Annexin V Binding Puffer (in Aqua dest 1:9 verdünnt) zugegeben und die Proben am Durchflusszytometer ausgewertet.

3.2.4 Zellzyklusanalysen

Um die Änderungen im Zellzyklus der behandelten Zellen zu untersuchen, führte man Messungen

mittels des Durchflusszytometers FACS Calibur™ durch. Die Zellen werden angesaugt und beschleunigt, sodass sie einzeln in einer Messkammer von einem Argonlaser mit 488nm Wellenlänge angestrahlt wurden. Die Streustrahlung wird durch Detektoren in der Messkammer gemessen, die die Auskunft über die Zellgröße (vorwärts gestreutes Licht, x-Achse) und die Zellgranulいた (seitwärts gestreutes Licht, y-Achse) geben. Die gewünschte Zellpopulation kann „im Fenster“ ausgewählt werden und in einer weiteren Grafik die Zellzyklusphasen verschiedenen Subpopulationen dargestellt werden. Auf der x-Achse wird die Propidiumiodid-Menge angezeigt. Propidiumiodid interkaliert mit der DNA. Die Zellen mit einfacher DNA stellen den Peak der G1 und G0 Phase dar. Die Zellen mit doppelter DNA-Menge befinden sich in der G2 Phase des Zellzyklus und stellen den G2 Peak dar. Zwischen den G1/G0 und den G2 Peak befinden sich die Zellen in der S-Phase. Bei jeder Messung wurden 20000 Ereignisse gezählt (Abb.2).

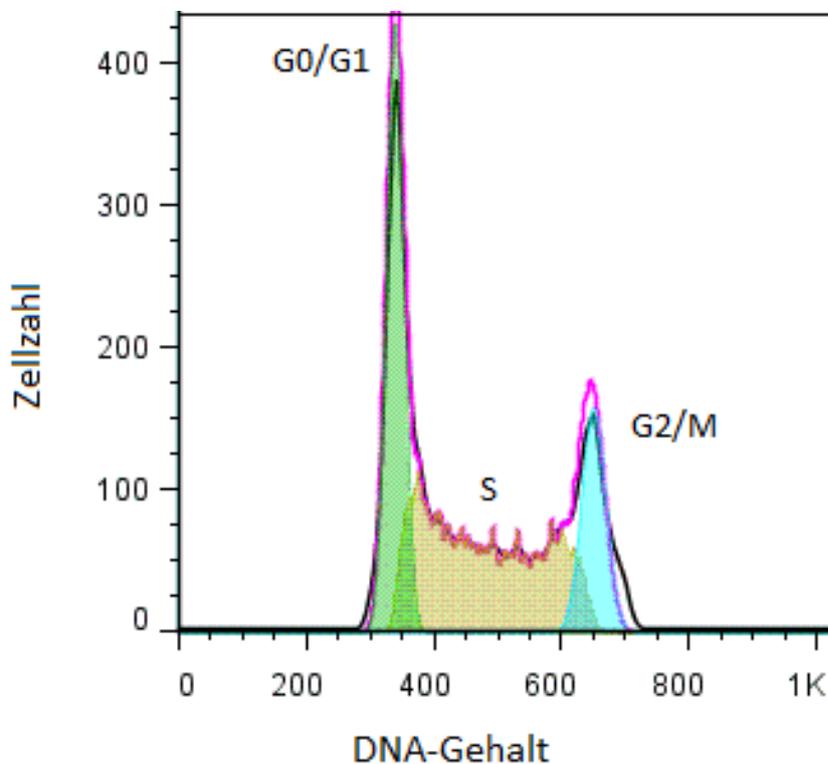


Abb.2 zeigt die Zellverteilung in der Zellzyklusanalyse bei der Zelllinie Granta -519 nach der Behandlung mit Flavopiridol. Der erste Peak wird von den Zellen in der G0/G1-Phase gebildet, der zweite Peak von Zellen, die sich in der G2/M Phase des Zellzyklus befinden. Dazwischen Zellen befindet sich die S-Phase. X-Achse: DNA-Gehalt, y-Achse: Zellzahl.

Versuchdurchführung:

Nach einer Inkubation von 72h wurden ca. $0,5 \times 10^6$ Zellen in FACS-Röhrchen pipettiert und bei

MATERIALEN UND METODEN

4°C für 10 min. bei 2000rpm zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Danach wurden die Zellen mit 1,5 ml gekühltem PBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml gekühltem Ethanol für 30 min. inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen mit PBS bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 50µl der 100µg/ml konzentrierten RNSase und 200µl Propidiumiodid zu dem Zellpellet pipettiert. Innerhalb einer Stunde wurden die Proben am Durchflusszytometer analysiert. Die Datenauswertung erfolgte mittels FlowJo.

4 ERGEBNISSE

4.1 Proliferationshemmung (Rituximab Monotherapie)

Der proliferationshemmende Effekt von Rituximab wurde in Abhängigkeit von der applizierten Konzentration in vier Mantelzelllinien (Rec-1, Jeko-1, Granta-519 und Z 138) und einer Kontroll-Zelllinie (BALL-1) getestet. Die Konzentrationen lagen zwischen 1,25µg und 50µg. Die Zellzählungen mittels Trypanblau-Ausschluss-Test erfolgten nach 24h, 48h und 72h um die Proliferationshemmung bei den verschiedenen Konzentrationen des Medikaments zu bestimmen.

In Abbildung 3a-b sind beispielhaft die Zellzählungen der Zelllinien Rec-1 und Granta-519 dargestellt, die zu den jeweiligen Null-Stunden ins Verhältnis gesetzt wurden. Die Zellen sind in Abhängigkeit der Rituximab-Konzentration langsamer gewachsen als die entsprechenden Kontrollproben mit unbehandelten Zellen.

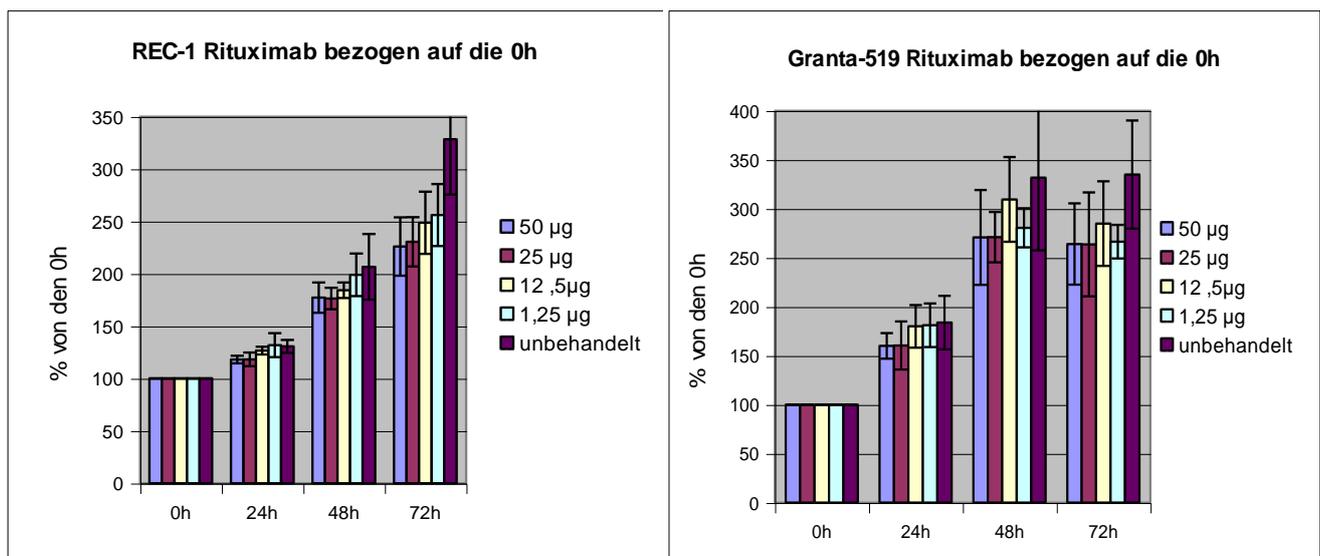


Abb. 3a

Abb. 3b

Bei der Abbildung 3a-b sind die Zelllinien Rec-1 und Granta-519 dargestellt. Auf der y-Achse sind die vitalen Zellen in % des Ausgangswerts normiert. Die Konzentration von Rituximab wurde von 50 µg bis 1,25 µg heruntertitriert. Bei jedem Versuch wurde eine Kontroll-Probe mit unbehandelten Zellen mituntersucht.

Da alle Zelllinie unterschiedliche Verdopplungszeiten haben, war eine vergleichende Aussage über den proliferationshemmenden Effekt von Rituximab in den unterschiedlichen Zelllinien nicht möglich, deshalb wurden die Zellzahlen auf den jeweiligen Kontrollwert der unbehandelten Zellen bezogen (Mittelwert + /- Standardabweichung). Als sensitivste Zelllinien zeichnete sich Rec-1 aus

ERGEBNISSE

(Abb. 4a). Granta-519 zeigte sich als mittelsensitive Zelllinie (Abb.4c). Bei dieser Zelllinie wurde eine Proliferationshemmung von 82% bis 88% nach 48h beobachtet, die nach 72h fast unverändert blieb. Die Zelllinien Z-138 (Abb.4d) und Jeko-1 (nicht dargestellt) waren durch Rituximab in deren Wachstumsverhalten kaum beeinflussbar. Auch BALL-1 wurde in ihrem Wachstumsprofil von Rituximab stark beeinflusst (Abb.4b). Unter den unterschiedlichen Konzentrationen des Medikaments zeigten sich kaum Unterschiede in der Proliferationshemmung sowohl nach 48h als auch nach 72h. Nach 24h war noch kein Effekt nachweisbar.

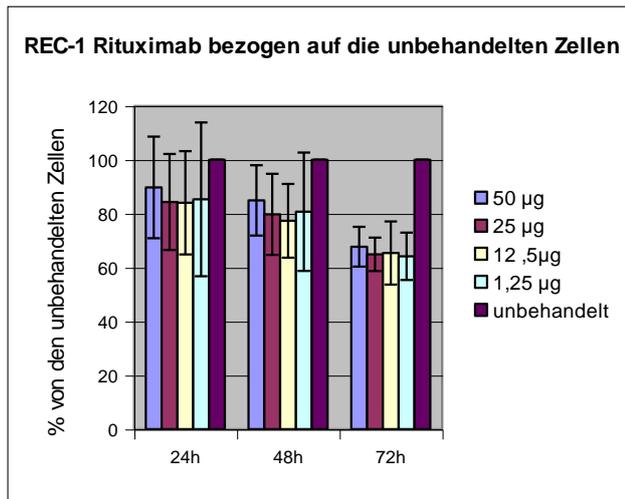


Abb. 4a

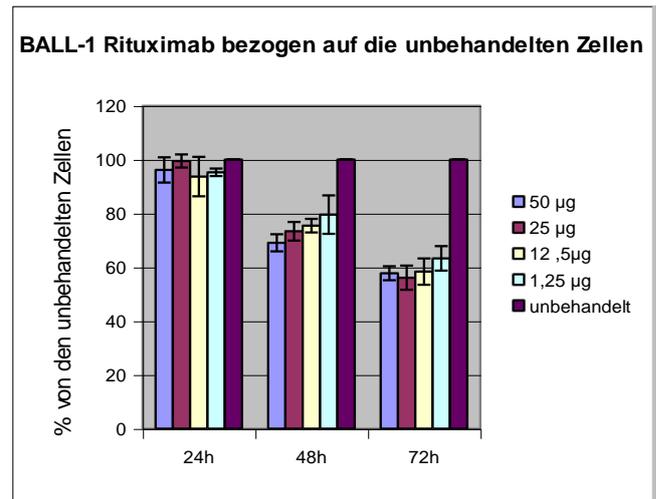


Abb. 4b

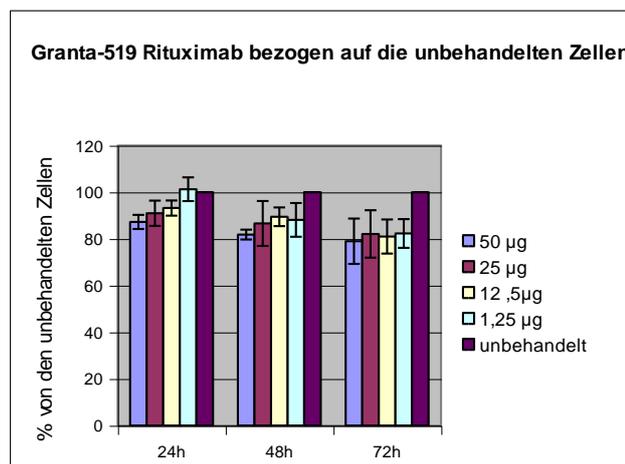


Abb. 4c

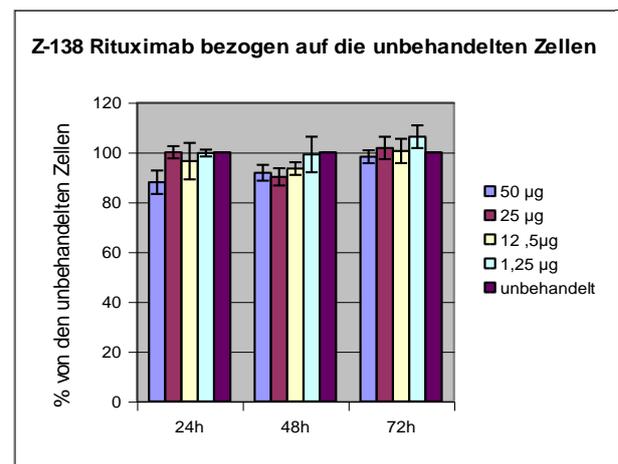


Abb. 4d

Bei der Abbildung 4a-4d sind die Zelllinien Rec-1, BALL-1, Granta-519 und Z-138 dargestellt. Auf der y-Achse sind die vitalen Zellen in % zu der unbehandelten Kontrolle normiert. Die Konzentration von Rituximab wurde von 50 µg bis 1,25 µg heruntertitriert. Bei jedem Versuch wurde eine Kontrollprobe mit unbehandelten Zellen mituntersucht.

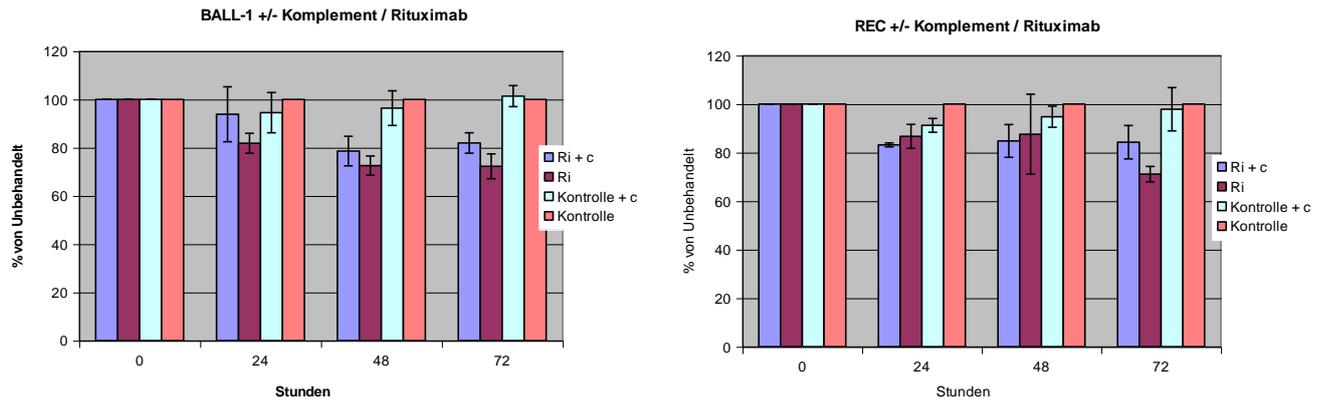
Es ergaben sich nur geringfügige Unterschiede der Wachstumshemmung in Abhängigkeit der Konzentration von Rituximab. Die Dosissteigerung erhöhte die Wirkung der Rituximab-Behandlung nur um 3-8% ohne signifikanten Unterschied in der Standardabweichung. Daher wurden die Kombinationsexperimente mit 12,5 µg/ml Rituximab durchgeführt, was auch der am häufigsten benutzten Konzentration in der Literatur entspricht.

4.2 Komplementassoziierte Wachstumsinhibition von Rituximab

Da Rituximab auch über die Aktivierung des Komplementsystems wirkt, wurde die komplementassoziierte Wachstumsinhibition von Rituximab in den zwei empfindlichen Zelllinien Rec-1 und BALL-1 getestet. Dazu wurden die Zellen in einem Medium mit 5 % humanen Serum statt Kälberserum kultiviert.

Die MCL-Zelllinie Rec-1 und die ALL-Zelllinie BALL-1 wurden auf einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ /ml eingestellt und bei 37°C mit Rituximab allein oder in Kombination mit humanem Serum inkubiert. Damit die unspezifische Wirkung vom Komplementsystem ausgeschlossen wurde, wurden zwei Kontrollen angesetzt, zum einen unbehandelten Zellen und zum anderen alleinige Behandlung mit humanem Serum. Anschließend erfolgten Zellzählungen mittels Trypanblau-Ausschluss-Test nach 24h, 48h und 72h um die komplementassoziierte Wachstumsinhibition von Rituximab zu bestimmen. (Mittelwert +/- Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten) (Abb.5).

Sowohl in der Zelllinie Rec-1 als auch in der Zelllinie BALL-1 wurde keine verstärkte Inhibition des Zellwachstums bei Kombination von Rituximab mit Komplementsystem beobachtet. Die Behandlung mit Rituximab als Monosubstanz zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu der Kombination mit dem Komplementsystem.



Bei der Abbildung 5 sind die Zelllinien BALL-1 und Rec-1 dargestellt. Auf der y-Achse sind die vitalen Zellen in % zu dem Ausgangspunkt und den unbehandelten Zellen normiert. Ri: Rituximab; c: Serum mit dem Komplementsystem. Jeder Versuch wurde dreifach angesetzt.

Da sich in den beiden Zelllinien nur geringfügige Unterschiede zwischen der alleinigen Behandlung mit Rituximab und der Kombination mit Humanalbumin zeigten, wurden die weiteren Experimente ohne Aktivierung des Komplementsystems durchgeführt.

4.3 Rituximab und Zytostatika

4.3.1 Rituximab und Fludarabin (Proliferationshemmung)

4.3.1.1 Trypanblau-Analysen

Um potentielle additive, synergistische und antagonistische Effekte bei der Kombination von Rituximab und Fludarabin zu bestimmen, wurde die einzelnen Substanzen als Monotherapie und in Kombination in den Zelllinien Rec.1, Granta-519 und BALL-1 eingesetzt (Abb.6).

In der Zelllinie Rec-1 wurde in den Trypanblau-Analysen unter der Kombination von Rituximab und Fludarabin lediglich nach 48h formal ein grenzwertiger Antagonismus beobachtet, der nach 72h nicht mehr nachweisbar war. Die maximale Wachstumshemmung der Kombination wurde am dritten Tag der Inkubation nachgewiesen. In den ersten zwei Tagen wurde kaum eine unterschiedliche Wirksamkeit zwischen der Rituximab-Monotherapie und der Kombination mit Fludarabin beobachtet.

In Granta-519 wurde zu allen Messpunkten ein additiver Effekt gesehen. Es zeigte sich nach 24h noch keine bedeutsame Zellreduktion. Die Zellzahl lag im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei 69 % vitaler Zellen nach 72h unter der Kombination von Rituximab und Fludarabin.

ERGEBNISSE

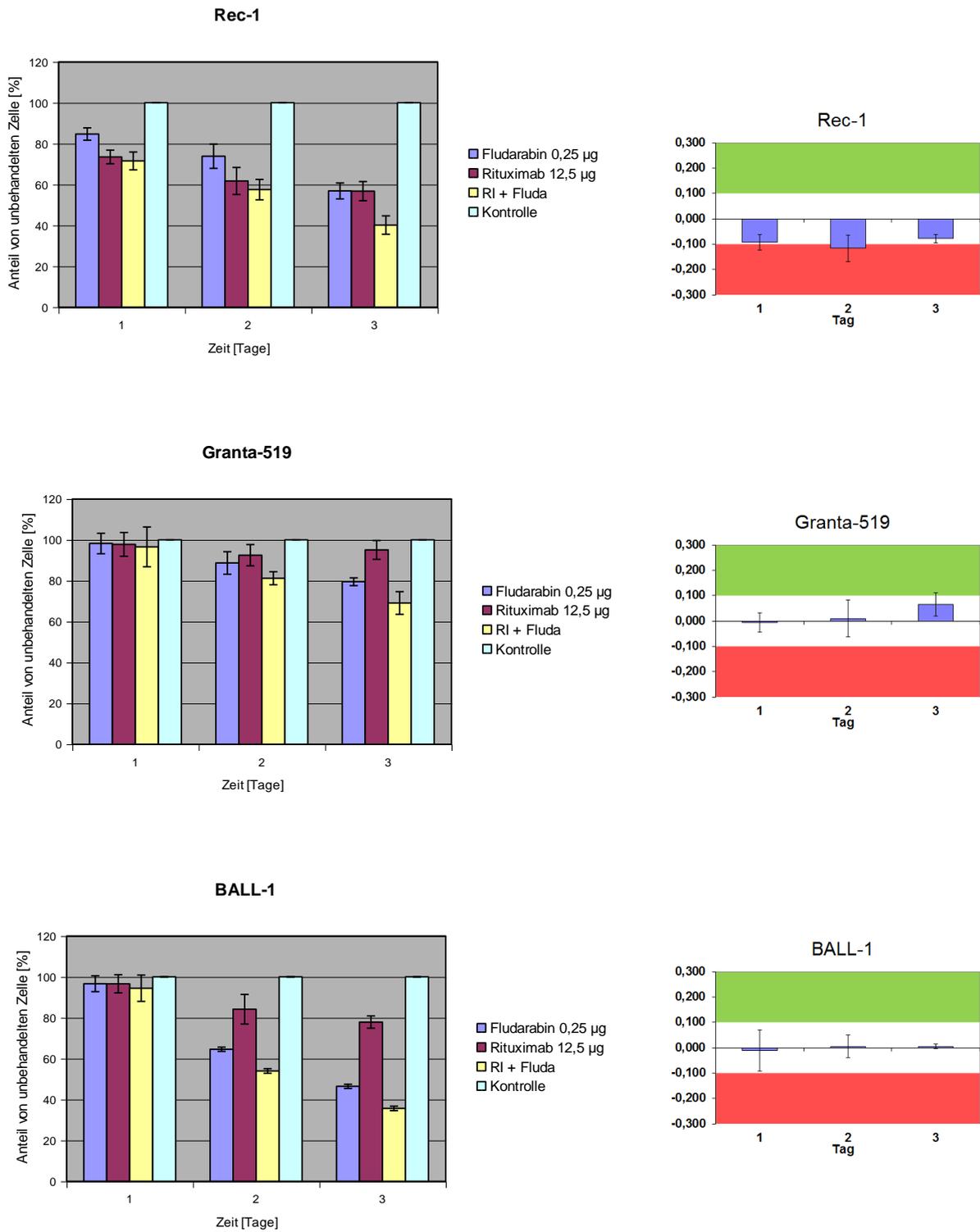


Abb.6 Auf der linken Seite ist die Zellzahl der Zelllinien Rec-1, Granta-519 und BALL-1 unter Behandlung mit Fludarabin und Rituximab als Monotherapie sowie in Kombination dargestellt (Anzahl der vitalen Zellen in % der unbehandelten Kontrolle). Auf der rechten Seite sind entsprechend die Fractions of product dargestellt. Die Effekte sind farbkodiert: grün- synergistisch; rot-antagonistisch; weiß-additiv.

Auch in BALL-1 zeigte sich additiver Effekt an allen Zeitpunkte. Die Zellreduktion bei der

alleinigen Behandlung mit Rituximab betrug 16% nach 48h und mit Fludarabin 35%. Unter der Kombination beider Medikamente war die Zellzahl auf 54% verringert. Nach 72h zeigte sich eine weitere Zellreduktion, die wiederum für die Kombination der beiden Medikamente am ausgeprägtesten war.

Somit zeigte sich unter der Kombination von Rituximab und Fludarabin in allen Zelllinien ein additiver Effekt.

4.3.1.2 Rituximab und Fludarabin (Apoptose)

In Granta-519 konnte man eine Zellzahlreduktion sowohl unter Rituximab als auch Fludarabin beobachten, wobei die Kombination zu einer noch stärkeren Zellzahlreduktion führte. In der Apoptose-FACS-Analyse hat sich dieses Ergebnis bestätigt (Abb.7). Während die frühapoptotischen Zellen bei der Behandlung mit Rituximab und Fludarabin als Einzelsubstanzen 15%-16% betrug, kam es unter der Kombination der beiden Medikamente zu einer Erhöhung der Frühapoptose auf 23%. Auch in der Spätapoptose zeigte sich eine Erhöhung von 11%- 13% unter den Monosubstanzen auf 17% unter der Kombination.

Einen minimalen Effekt konnte man auch bei der Zelllinie Rec-1 beobachten. Die Steigerung der Frühapoptose betrug 5% und bei der Spätapoptose 3%.

In der Kontrollzelllinie BALL-1 war der Effekt am deutlichsten. In den Trypanblau-Zählungen waren nach Behandlung mit Rituximab 78% und mit Fludarabin 46% der Zellen in Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen vital. Nach Behandlung mit der Kombination waren nur noch 36% der Zellen vital. Dies spiegelte sich wiederum in der Apoptose-FACS-Analyse wieder. Die frühapoptotischen Zellen nach Monotherapie betrug 6% bis 8%, nach gleichzeitiger Gabe von Rituximab und Fludarabin stieg diese Rate auf 23% an. Auch die Spätapoptose zeigte eine Steigerung von 5%-6% auf 14%.

ERGEBNISSE

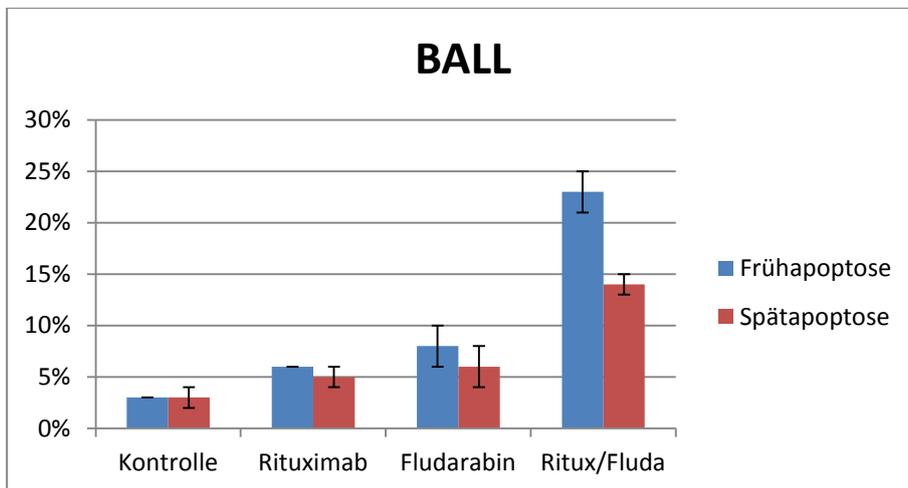
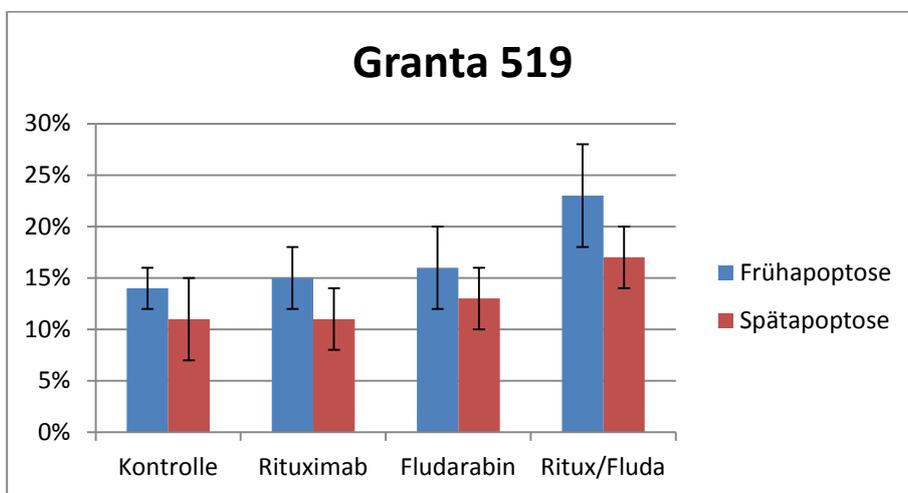
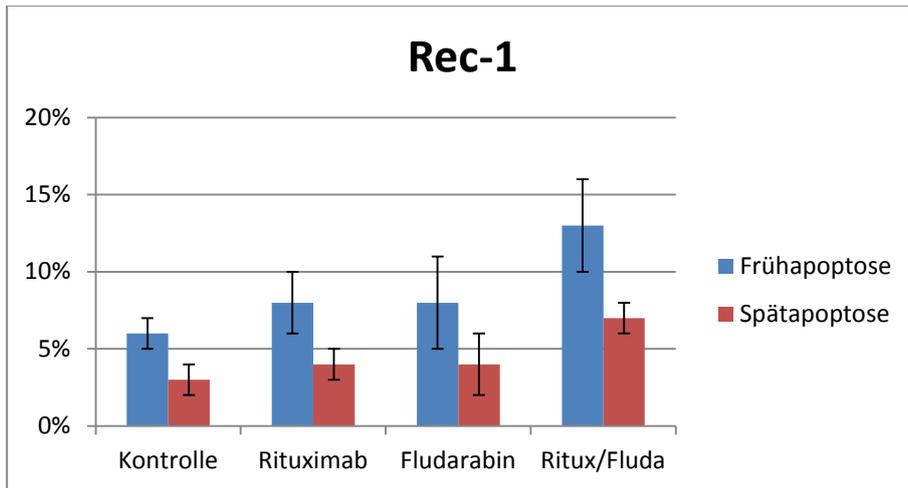


Abb.7 Früh- und Spätapoptose in den Zelllinien Rec-1, Granta-519 und BALL-1 unter Behandlung mit Fludarabin und Rituximab als Monotherapie und in Kombination sowie der unbehandelten Kontrollen. Fluda: Fludarabin; Ritux: Rituximab

4.3.2 Rituximab und Mitoxantron (Proliferationshemmung)

4.3.2.1 Trypanblau-Analysen

Als nächstes wurde der proliferationshemmende Effekt von Rituximab und Mitoxantron in den Trypanblau-Analysen untersucht (Abb.8).

In der Zelllinie Rec-1 wurde lediglich nach 24h ein Synergismus beobachtet, der aber nach 48h nicht mehr nachweisbar war. Die maximale Zellreduktion wurde am dritten Tag der Inkubation erreicht. Die Zahl der vitalen Zellen nach Therapie mit Rituximab lag bei 57% und nach Behandlung mit Mitoxantron bei 15%. Der Effekt bei der Kombination der beiden Medikamente war am stärksten und der Anteil der vitalen Zellen betrug nur noch 8% nach 72h.

In Granta-519 wurden zu allen Messpunkten additive Effekte gesehen. Es wurde eine bedeutsame Wachstumshemmung nach Inkubation mit Mitoxantron am Tag zwei und drei beobachtet, wobei sich dieser Effekt nach Zugabe des (in der Monotherapie kaum wirksamen) Rituximab kaum änderte. Sowohl unter alleiniger Behandlung mit Mitoxantron als auch nach einer Kombinationstherapie mit Rituximab lagen die vitalen Zellen bei 20% nach 48h bzw. bei 10% nach 72h.

Auch in der Kontrollzelllinie BALL-1 zeigte sich additiver Effekt bei allen Messpunkten. Eine bedeutsame Hemmung der Zellproliferation wurde ebenfalls vor allem durch Mitoxantron bedingt. Die Zellzahl der vitalen Zellen betrug nach 48h 28% im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, bzw. 14% nach 72h sowohl nach einer Mitoxantron-Monotherapie als auch der Kombination.

Auch unter der Kombinationstherapie von Rituximab und Mitoxantron zeigte sich in allen Zelllinien ein additiver Effekt.

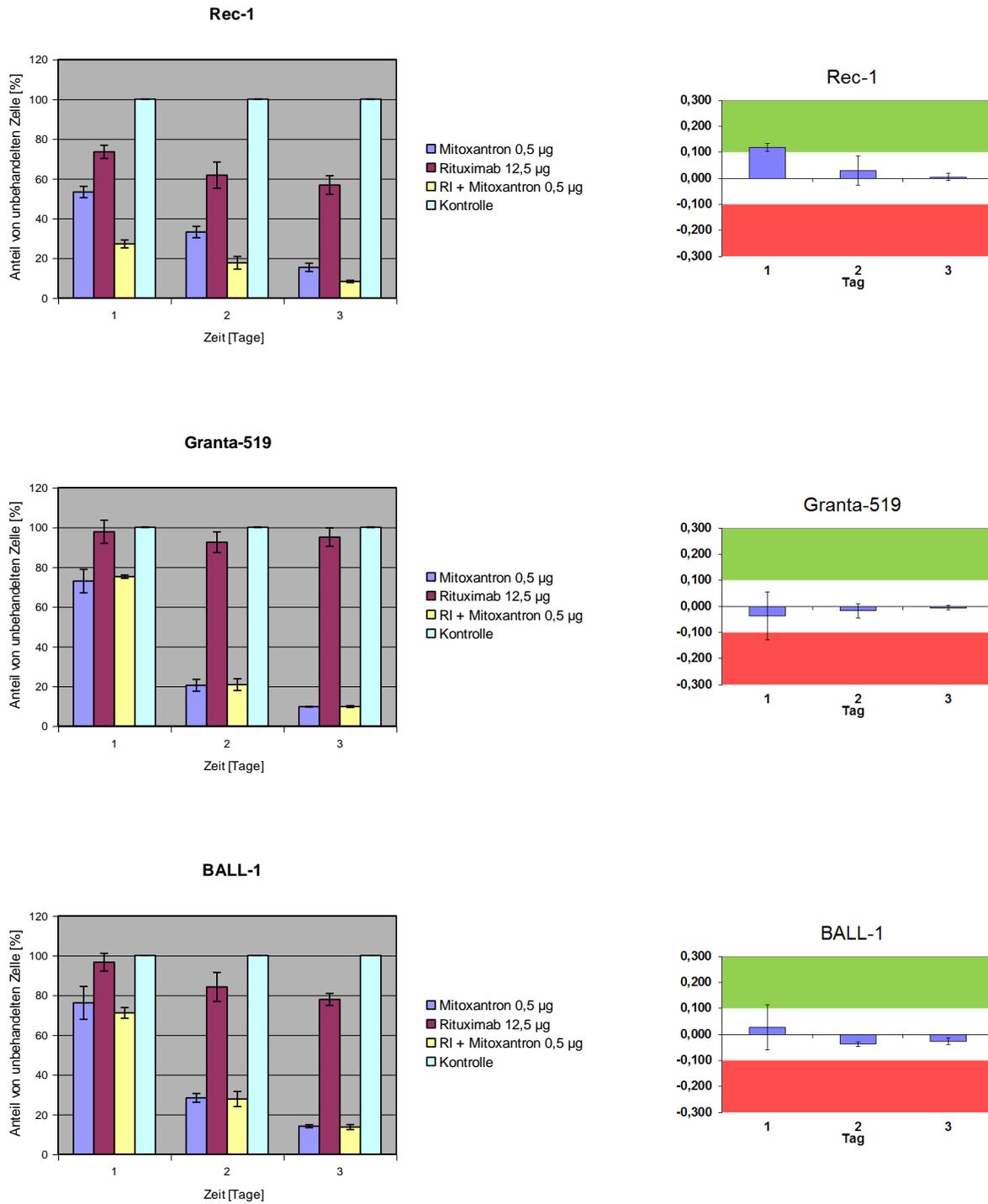


Abb. 8 Auf der linken Seite ist die Zellzahl der Zelllinien Rec-1, Granta-519 und BALL-1 unter Behandlung mit Mitoxantron und Rituximab als Monotherapie sowie in Kombination dargestellt (Anzahl der vitalen Zellen in % der unbehandelten Kontrolle). Auf der rechten Seite sind entsprechend die Fractions of product dargestellt. Die Effekte sind farbkodiert: grün- synergistisch; rot-antagonistisch; weiß-additiv.

4.3.2.2 Rituximab und Mitoxantron (Apoptose)

Mitoxantron wurde als Monosubstanz als auch in Kombination mit Rituximab in der Zelllinie Rec-1

ERGEBNISSE

getestet. Dabei zeigte sich eine sehr hohe proapoptotische Wirkung dieser Substanz. Unter der Behandlung mit Mitoxantron waren im Trypanblau-Test nur 15% der Zellen vital und in Kombination mit Rituximab- nur noch 8% der Zellen. Diese Ergebnisse wurden auch in Apoptose-FACS-Analysen bestätigt (Abb.9). Während die frühapoptotischen Zellen nach der Behandlung mit Rituximab 10% betrug, stieg der frühapoptotischen Anteil für die Kombination auf 48%. Eine Spätapoptose wurde in dieser Zelllinie nach alleiniger Behandlung mit Rituximab nicht beobachtet. Dagegen betrug der spätapoptotischen Zellen nach Inkubation mit Mitoxantron 22%. Der spätapoptotischen Anteil nach der Gabe beider Substanzen blieb unverändert.

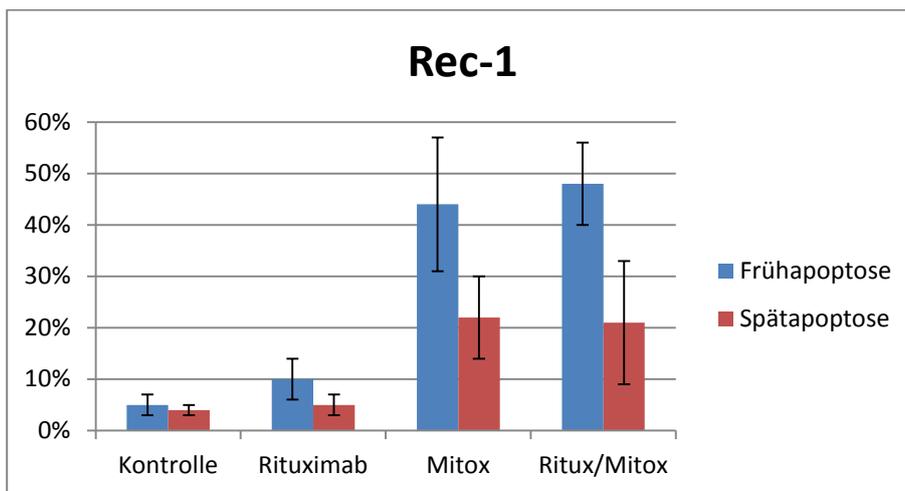


Abb.9 Früh- und Spätapoptose in der Zelllinie Rec-1 unter Behandlung mit Mitoxantron und Rituximab als Monotherapie und in Kombination sowie der unbehandelte Kontrolle. Mitox: Mitoxantron; Ritux: Rituximab.

4.4 Kombination von Rituximab mit molekularen Substanzen.

4.4.1 Rituximab und Bortezomib (Proliferationshemmung)

4.4.1.1 Trypanblau-Analysen

Die Wachstumshemmung von Rituximab wurde auch in Kombination mit Bortezomib geprüft (Fig10).

Unter der Behandlung der Zelllinie Rec-1 mit Bortezomib zeigte sich keine Wachstumshemmung. Im Gegensatz dazu war die Empfindlichkeit der Zelllinie Granta-519 gegenüber Bortezomib sehr stark. Nach 48h waren nur 11% der Zellen nach der Therapie mit Bortezomib vital. Für die Kombination mit Rituximab veränderte sich dieser Effekt kaum und blieb nach 72h weiterhin bestehen.

ERGEBNISSE

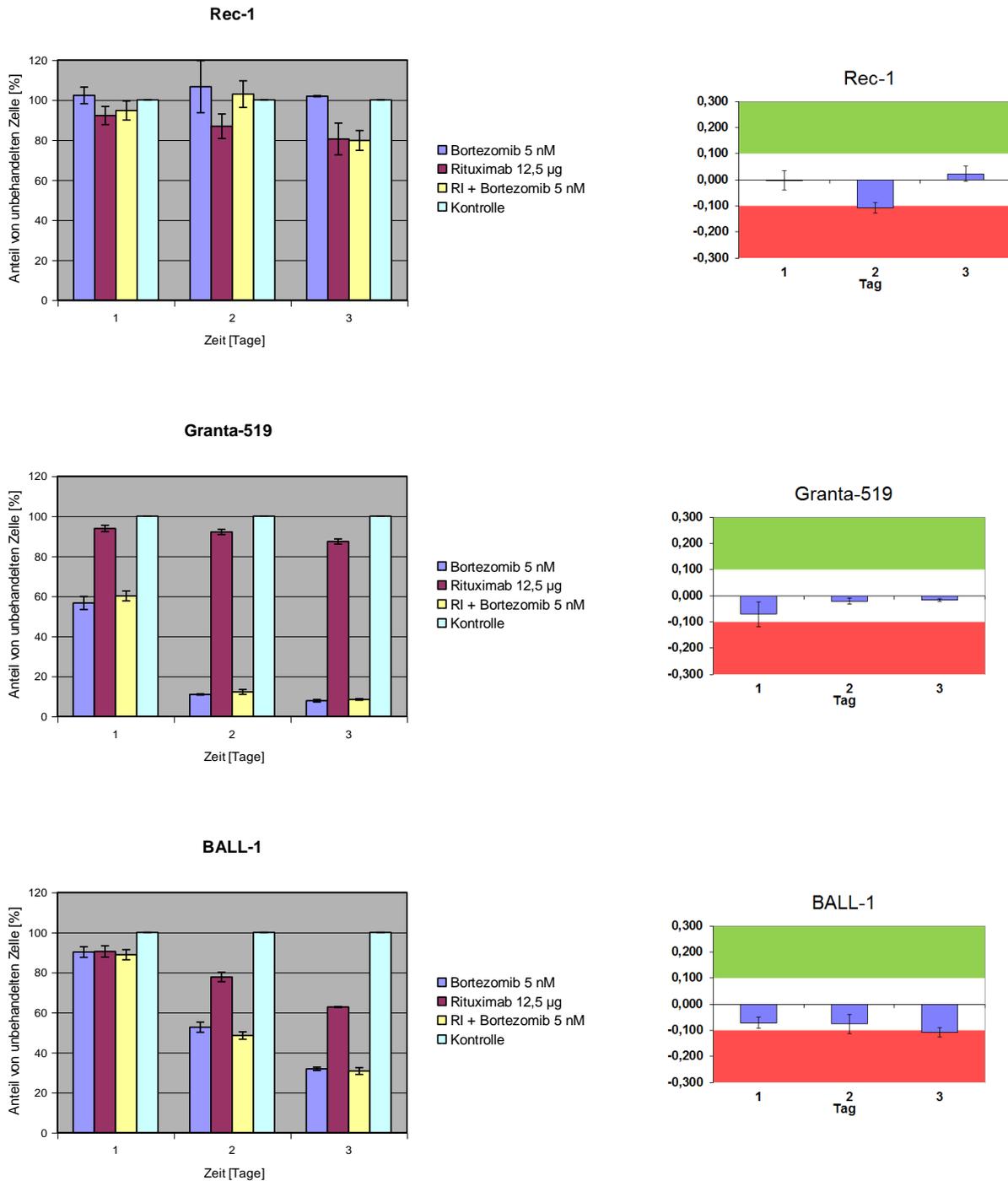


Abb.10 Auf der linken Seite ist die Zellzahl der Zelllinien Rec-1, Granta-519 und BALL-1 unter Behandlung mit Bortezomib und Rituximab als Monotherapie sowie in Kombination dargestellt (Anzahl der vitalen Zellen in % der unbehandelten Kontrolle). Auf der rechten Seite sind entsprechend die Fractions of product dargestellt. Die Effekte sind farbkodiert: grün- synergistisch; rot-antagonistisch; weiß-additiv.

Die Kontrollzelllinie BALL-1 war auf Bortezomib empfindlich und es zeigten sich zu allen Zeitpunkten additive Effekte. In Kombination mit Rituximab wurde jedoch kaum Änderung dieser Effekte beobachtet. Sowohl nach alleiniger Behandlung mit Bortezomib als auch nach einer Kombinationstherapie lagen die vitalen Zellen bei ca. 50% nach 48h bzw. bei ca. 30% nach 72h.

4.4.1.2 Rituximab und Bortezomib (Apoptose)

Um den genauen Anteil der apoptotischen Zellen nach der Inkubation mit den Proteasomen-Inhibitoren bei den Trypanblau-Analysen zu bestimmen, wurden Apoptose-FACS-Analysen durchgeführt.

Die Kombination von Rituximab mit Bortezomib zeigte sowohl in Rec-1 als auch in der Kontrollzelllinie BALL-1 eine sehr ausgeprägte Apoptose-Induktion (Abb.11).

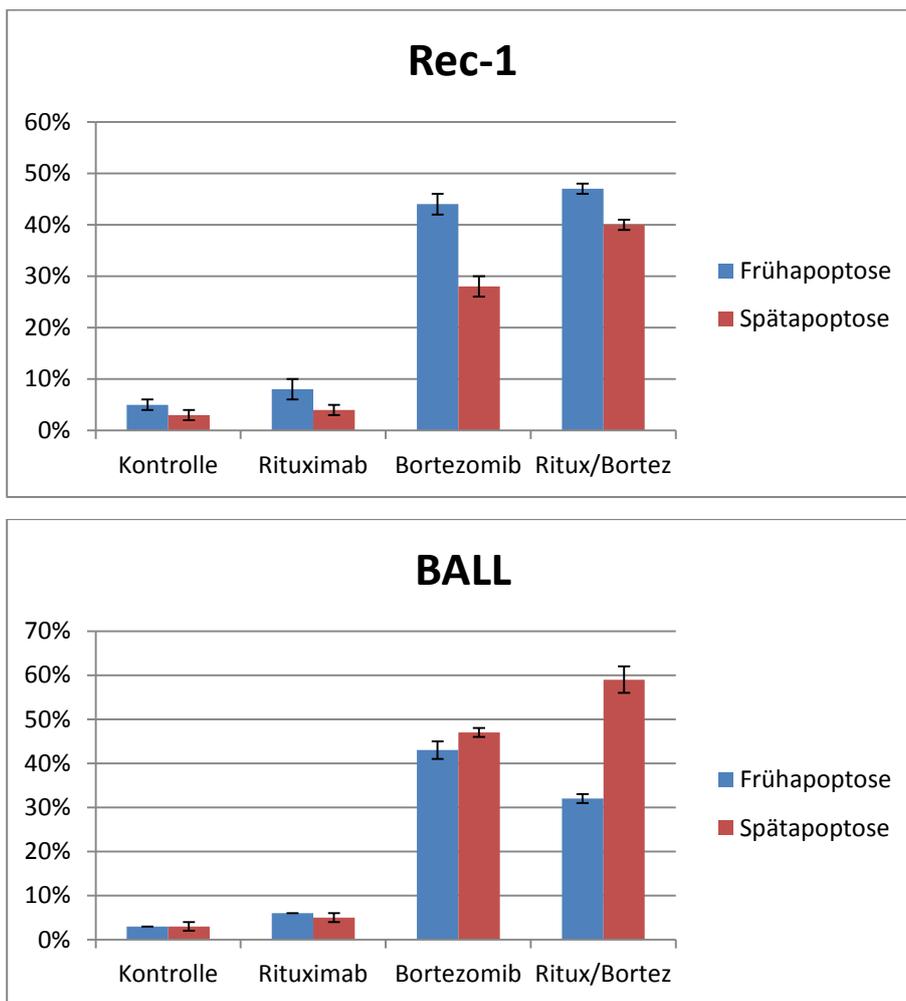


Abb.11 Früh- und Spätapoptose in den Zelllinien Rec-1 und BALL-1 unter Behandlung mit Bortezomib und Rituximab als Monotherapie und in Kombination sowie der unbehandelten Kontrollen. Bortez: Bortezomib; Ritux: Rituximab

Obwohl in Rec-1 in den Zellzahl-Analyse kein Effekt gesehen wurde, zeigte sich unter der Behandlung mit Bortezomib eine deutlich erhöhte Frühapoptose von 44% und Spätapoptose von 28% im Vergleich von nur 3%-8 % für die Rituximab-behandelten Zellen. Für die Kombination von Rituximab und Bortezomib lag der Anteil der frühapoptotischen Zellen bei 47% und in der Spätapoptose bei 40%.

Auch in der Kontrollzelllinie BALL-1 wurde eine ausgeprägte Apoptose bei der Behandlung mit Bortezomib beobachtet. Die Frühapoptose betrug 43% und die Spätapoptose 47%. Bei der Kombination beider Medikamente erhöhte sich die Spätapoptose auf 59%.

4.4.2 Rituximab und Everolimus (Rad 001) (Proliferationshemmung)

4.4.2.1 Trypanblau-Analysen

Der Einfluss von Rituximab wurde auch in Kombination mit dem m-TOR-Inhibitor Everolimus (Rad 001) getestet. Dabei wurde ein additiver Effekt in der Zelllinie Rec-1 und ein antagonistischer Effekt in den Zelllinien BALL-1 und Granta-519 beobachtet (Abb.12).

Die Inhibition des Zellwachstums in Rec-1 war für die einzelnen Substanzen Rituximab und Rad001 nach 48h etwa vergleichbar und in der Kombination um ca. 15% ausgeprägter. Nach 72h veränderte sich der Effekt von Rituximab kaum. Die Zellzahl der mit Everolimus (Rad 001) behandelten Zellen sank aber von 86% nach 48h auf 70% nach 72h. Die Inhibition der Proliferation nach Behandlung der Zellen mit beiden Substanzen war noch ausgeprägter. Nach dem zweiten Tag betrug die Zellzahl der vitalen Zellen 72% und nach dem dritten Tag war nur noch 56%.

In der Zelllinie Granta-519 ließ sich ein antagonistischer Effekt zu allen Zeitpunkten zeigen. Nach 72h lag die Standardabweichung eindeutig im antagonistischen Bereich, d.h. der proliferationshemmende Effekt war mit der alleinigen Behandlung mit Everolimus (Rad 001) stärker als mit der Kombination mit Rituximab.

In der Zelllinie BALL-1 zeigte sich ein eindeutiger Antagonismus nach 48h sowie nach 72h (Fractional product -0,133 bzw. -0,151). Die Standardabweichung lag ebenfalls im antagonistischen Bereich. Es zeigte sich nach 48h eine Zellzahlverringering auf 78% bei den mit Rituximab behandelten Zellen. Unter der Behandlung mit Everolimus (Rad 001) sowie der Kombination mit Rituximab wurde eine Zellwachstumshemmung auf 55 % beobachtet. Nach 72h war die Zellzahlreduktion sowohl nach Behandlung mit Everolimus (Rad 001) als auch nach Behandlung mit den beiden Medikamenten vergleichbar und betrug 60% der unbehandelten Zellen.

ERGEBNISSE

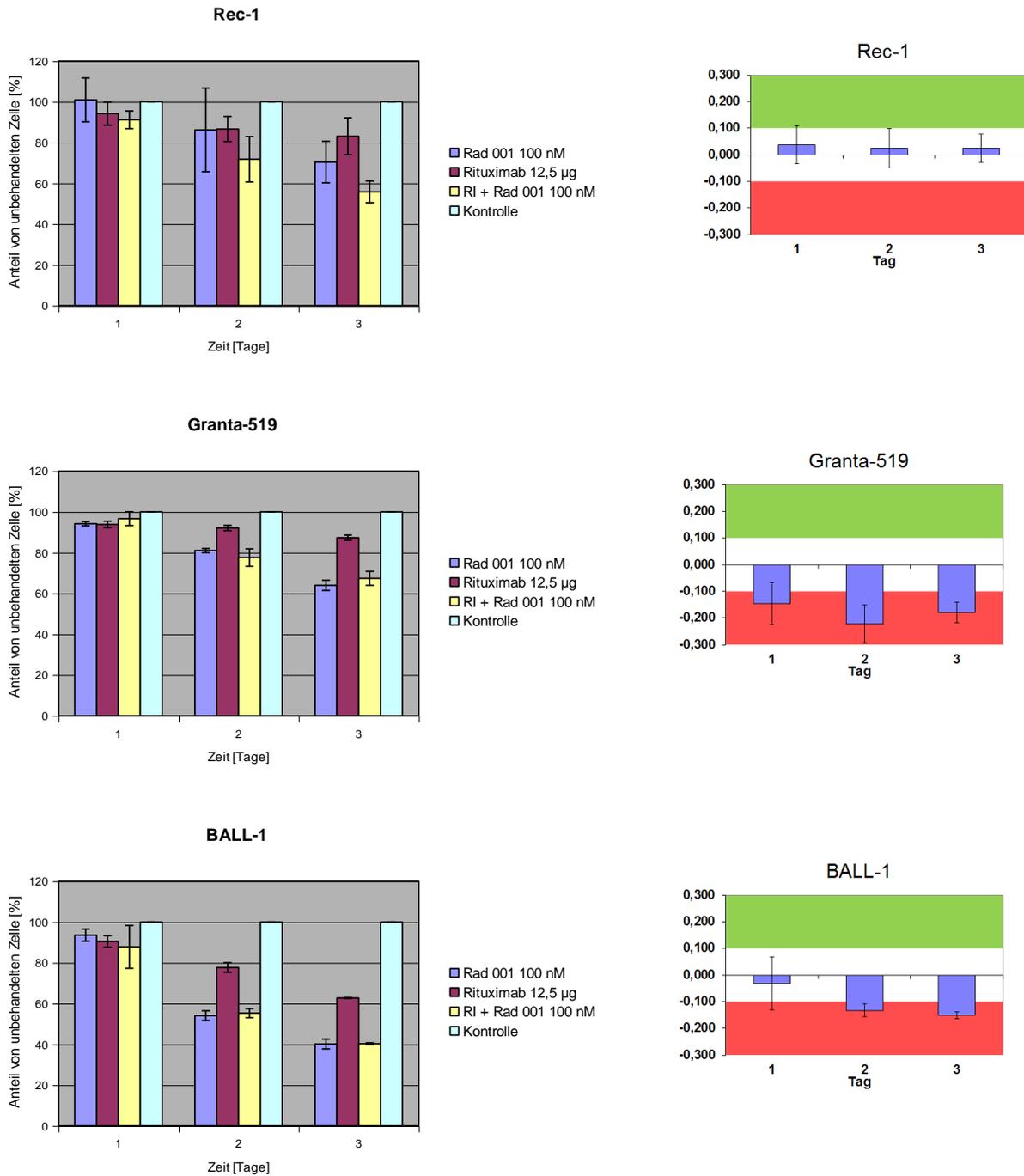


Abb. 12 Auf der linken Seite ist die Zellzahl der Zelllinien Rec-1, Granta-519 und BALL-1 unter Behandlung mit Everolimus (Rad 001) und Rituximab als Monotherapie sowie in Kombination dargestellt (Anzahl der vitalen Zellen in % der unbehandelten Kontrolle). Auf der rechten Seite sind entsprechend die Fractions of product dargestellt. Die Effekte sind farbkodiert: grün- synergistisch; rot-antagonistisch; weiß-additiv.

ERGEBNISSE

4.4.2.2 Rituximab und Everolimus (Rad 001) (Apoptose)

Die Kombination von Rituximab mit dem m-TOR-Inhibitor Everolimus (Rad 001) wurde in den Mantelzelllinien Granta-519 und Rec-1 sowie in der Kontrollzelllinie BALL-1 getestet (Abb.13). Bei allen drei Zelllinien wurde keine nennenswerte Apoptose beobachtet.

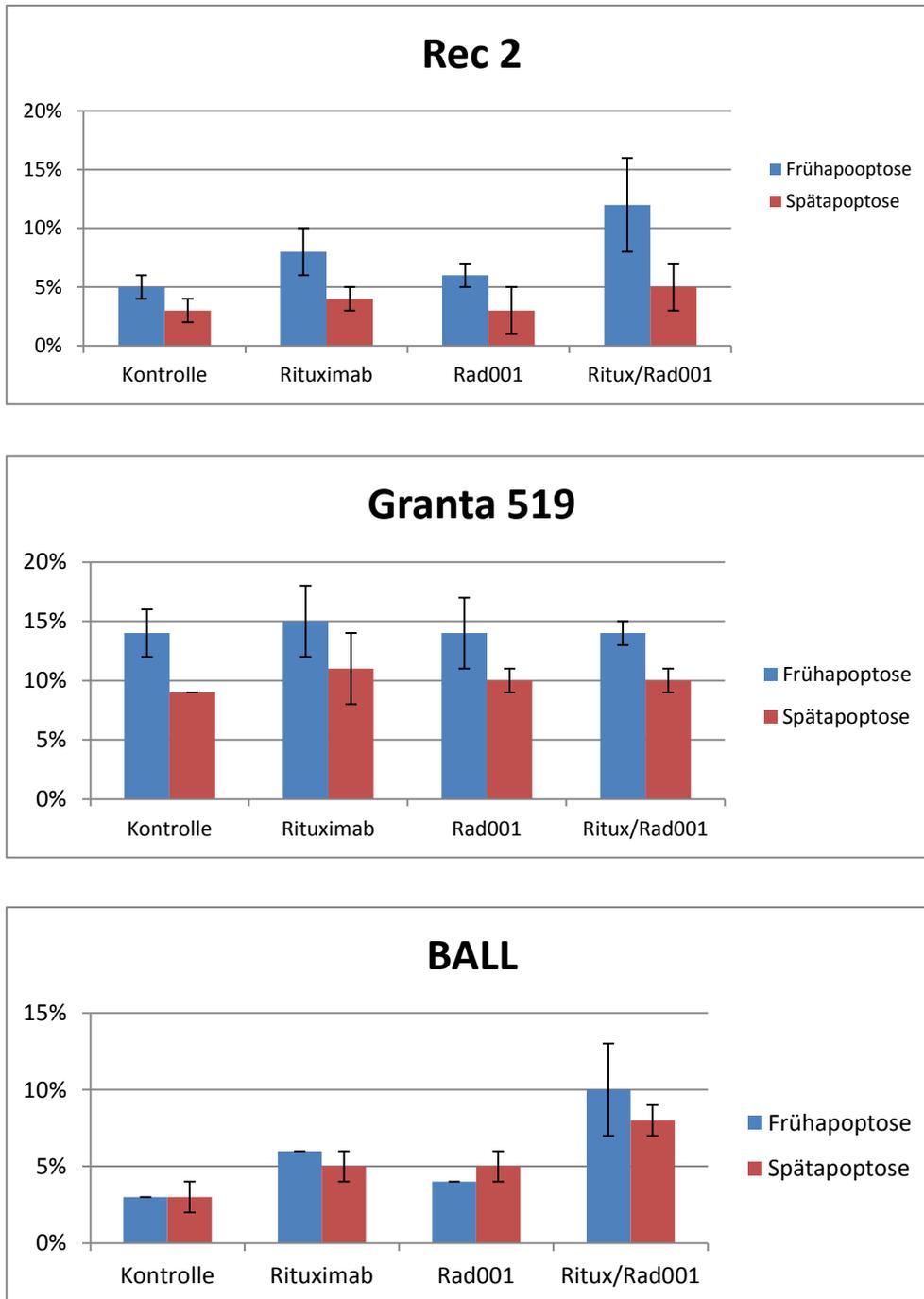


Abb.13 Früh- und Spätapoptose in den Zelllinien Rec-1, Granta-519 und BALL-1 unter Behandlung mit Everolimus (Rad 001) und Rituximab als Monotherapie und in Kombination sowie der unbehandelten Kontrollen. Ritux: Rituximab.

4.4.2.3 Rituximab und Everolimus (Rad 001) (Zellzyklus)

Zunächst wurde die Auswirkung von Rituximab und Everolimus (Rad 001) auf den Zellzyklus in den Zelllinien Rec-1, Granta-519 und BALL-1 untersucht (Abb.14).

In der Zelllinie Rec-1 kam es nach 72h zu einem leichten G1-Block. In den unbehandelten Proben befanden sich 44% der Zellen in der G1-Phase. Nach einer Behandlung mit Everolimus (Rad 001) stieg der Anteil der Zellen in der G1-Phase auf 52%. Unter der Kombination von Rituximab und Everolimus (Rad 001) bestand der G1-Block fort. Gleichzeitig wurde eine Reduktion der Zellen in der S-Phase von 41% auf 33% nach der Therapie mit Rad001 bzw. auf 26% nach der Behandlung mit beiden Medikamenten beobachtet.

In der Zelllinie Granta-519 zeigte sich kein G1-Block, d.h. keine nennenswerte Verschiebungen der Zellzyklus.

Auch in der Kontrollzelllinie BALL-1 wurde einen leichten G1-Block sowohl unter der Therapie mit Rad001 als auch unter der Therapie mit Rituximab beobachtet. In der Kombination von den beiden Medikamenten wurde dieser Effekt aufgehoben. Unter der Therapie mit Everolimus (Rad 001) und Rituximab als Monosubstanzen betrug die Zellzahl in der G1-Phase 12% mehr im Vergleich mit den unbehandelten Zellen. Unter der Kombinationstherapie waren nur noch 5% mehr Zellen in der G1-Phase im Vergleich zu der Kontrolle.

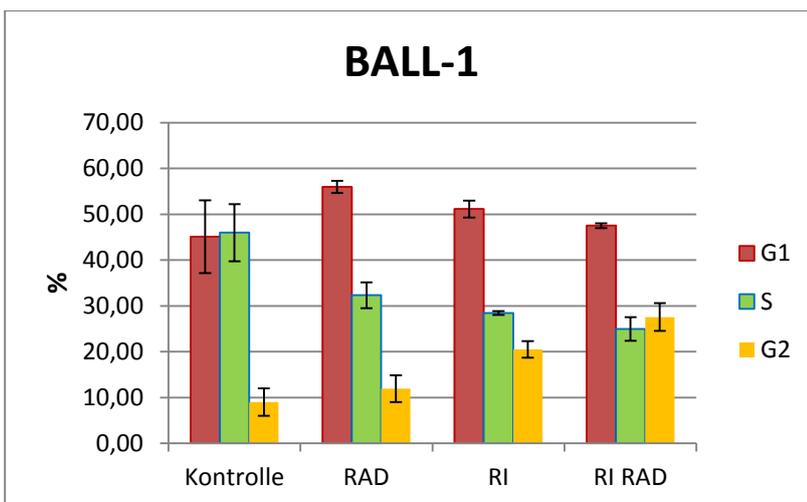
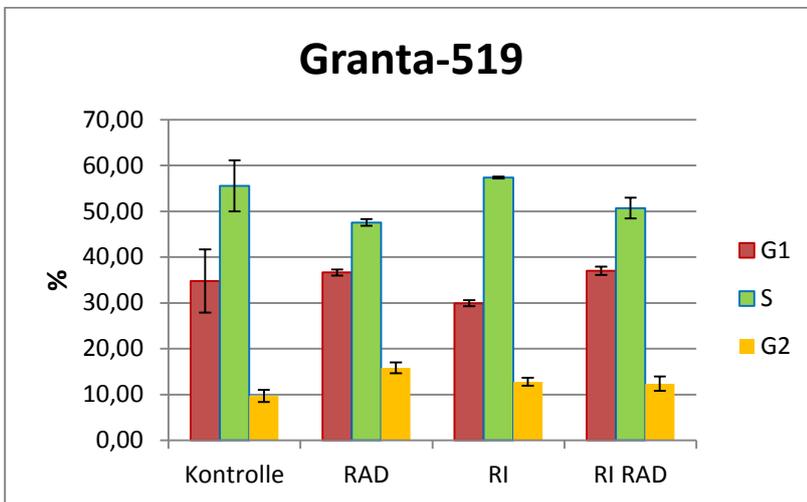
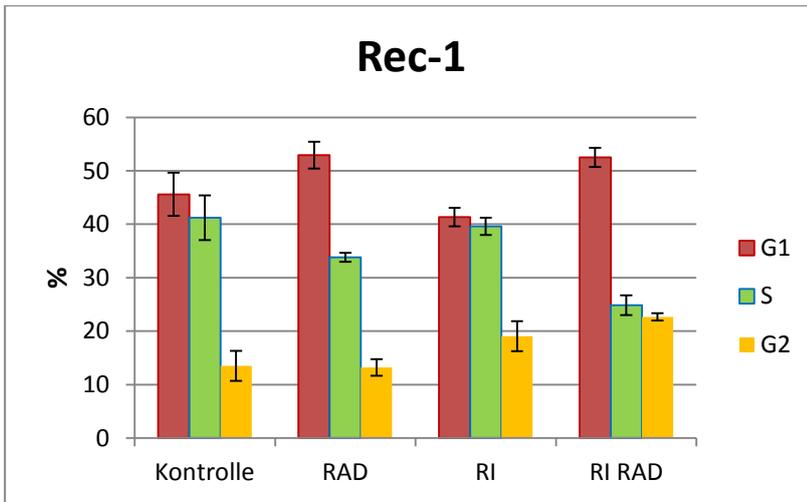


Abb.14 Zellzyklus in den MCL Zelllinien Rec-1, Granta-519 und der Kontrolle BALL-1. Die Zellzyklus-Phasen sind farbkodiert:rot-G1-Phase; grün-S-Phase; gelb-G2 Phase. Auf der y-Achse ist der Prozentsatz (%) dargestellt. Rad: Everolimus (Rad 001); RI: Rituximab; RI Rad: Rituximab und Everolimus (Rad 001).

4.4.3 Rituximab und Flavopiridol (Proliferationshemmung)

4.4.3.1 Trypanblau-Analysen

In den weiteren Experimenten wurden die potenziellen additiven, synergistischen und antagonistischen Effekte der Kombination von Rituximab und Flavopiridol getestet (Abb.15).

Der Einfluss von Rituximab auf die Zelllinie Rec-1 war minimal an allen Messpunkten. Der wachstumshemmende Effekt von Flavopiridol war deutlich nach 24h und betrug 31%. In den nächsten Tagen kam es zu weiterer Zellzahlreduktion um 59% nach 48h und 73% nach 72h. Bei der Kombination der beiden Medikamente wurde nur ein Effekt von Flavopiridol beobachtet.

Ein eindeutiger Antagonismus zeigte sich bei der Zelllinie Granta-519, der bei allen Messpunkten zu sehen war und zu Fraktion of product Werte zwischen -0,177 und -0,203 führte. Nach 48h war der Effekt der Kombination geringer als der Effekt der alleinigen Flavopiridol-Behandlung. An den anderen Zeitpunkten wurden kaum Unterschiede zwischen der Flavopiridol-Monotherapie und der Kombination beobachtet.

In BALL-1 wurden bei allen Messpunkten additive Effekte beobachtet. Ab dem zweiten Tag wurde eine Zellreduktion auf 72% bei alleiniger Behandlung mit Rituximab und auf 49% bei der alleinigen Behandlung mit Flavopiridol gezeigt. Die stärkste Verringerung der Zellzahl wurde bei der Kombination von den beiden Substanzen beobachtet. Der Prozentsatz der vitalen Zellen betrug 40% von den unbehandelten Zellen. Nach 3 Tage sank die Zellzahl weiterhin unwesentlich.

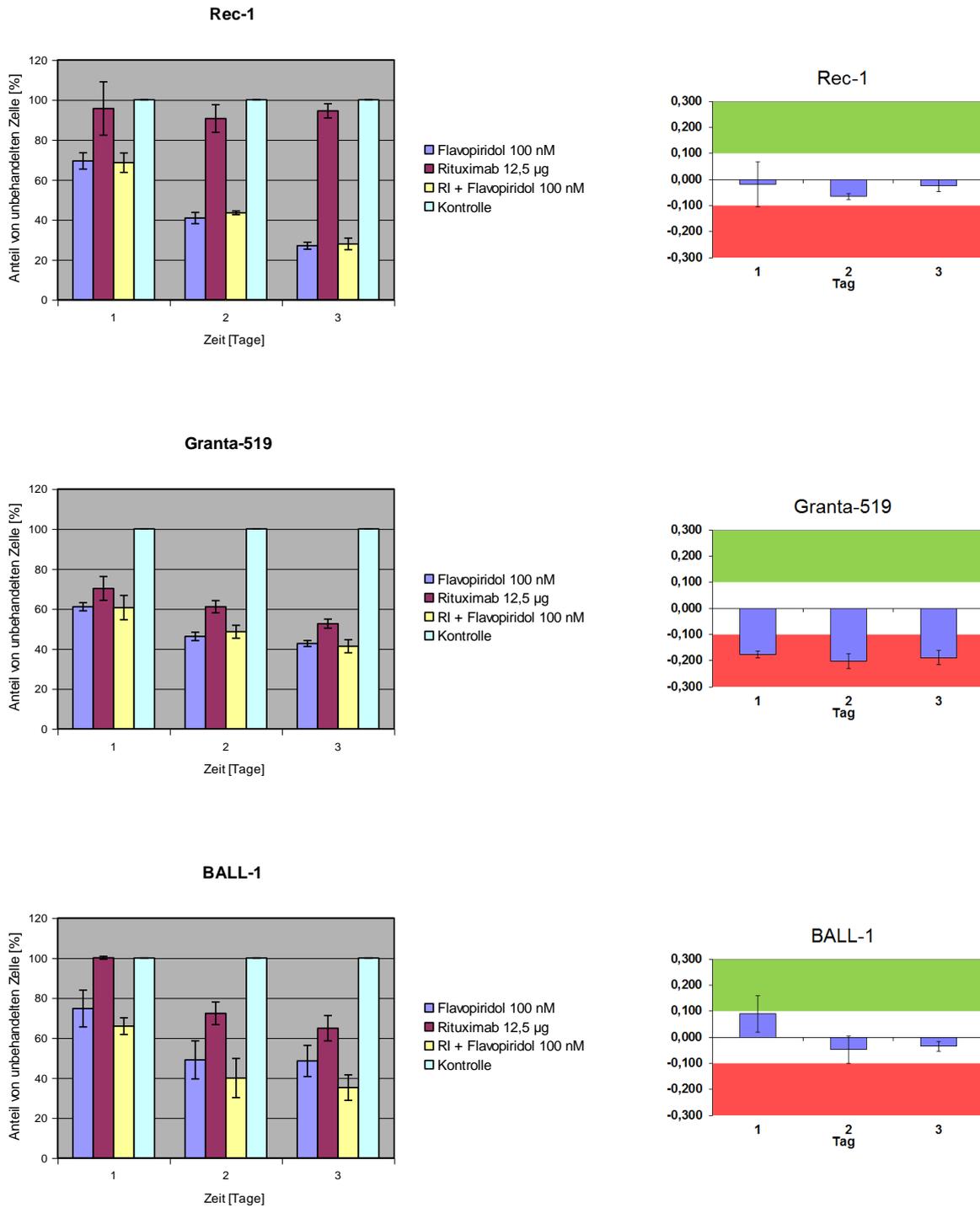


Abb. 15 Auf der linken Seite ist die Zellzahl der Zelllinien Rec-1, Granta-519 und BALL-1 nach Behandlung mit Flavopiridol und Rituximab als Monotherapie sowie in Kombination dargestellt (Anzahl der vitalen Zellen in % der unbehandelten Kontrolle). Auf der rechten Seite sind entsprechend die Fractions of product dargestellt. Die Effekte sind farbkodiert: grün- synergistisch; rot-antagonistisch; weiß-additiv.

4.4.3.2 Rituximab und Flavopiridol (Apoptose)

Eine deutliche Zellzahlreduktion wurde unter der Behandlung der Kontrollzelllinie BALL-1 mit Rituximab und seinem Kombinationspartner Flavopiridol beobachtet. Die Zellzahl der

ERGEBNISSE

unbehandelten Zellen lag bei $2,14 \times 10^6$ Zellen/ml und sank auf $1,39 \times 10^6$ Zellen/ml nach Behandlung mit Rituximab beziehungsweise auf $1,04 \times 10^6$ Zellen/ml nach Behandlung mit Flavopiridol. Unter der Kombination beider Medikamente betrug die Zellzahl nur noch $0,76 \times 10^6$ Zellen/ml. Diese Ergebnisse spiegelten sich im Apoptose-FACS wider (Abb.16). Sowohl die frühapoptotischen als auch die spätapoptotischen Zellen betrug nur 5% - 6% unter alleiniger Behandlung mit Rituximab. Unter Monotherapie mit Flavopiridol stiegen diese Raten auf 20%, und unter der Kombination beider Substanzen stieg die Frühapoptose auf 36% und die Spätapoptose auf 32%.

In der Zelllinie Granta-519 war dieser Effekt nicht zu sehen. Die Zellzahl der unbehandelten Zellen lag bei $1,76 \times 10^6$ Zellen/ml und sank auf $1,65 \times 10^6$ Zellen/ml unter Therapie mit Rituximab beziehungsweise auf $1,38 \times 10^6$ Zellen/ml unter Therapie mit Flavopiridol. Unter der Kombination der beiden Medikamente betrug die Zellzahl $1,29 \times 10^6$ Zellen/ml. In der FACS-Analyse ergab sich kaum Unterschied zwischen den behandelten und den unbehandelten Zellen sowohl in der Früh- als auch in der Spätapoptose (Abb.16).

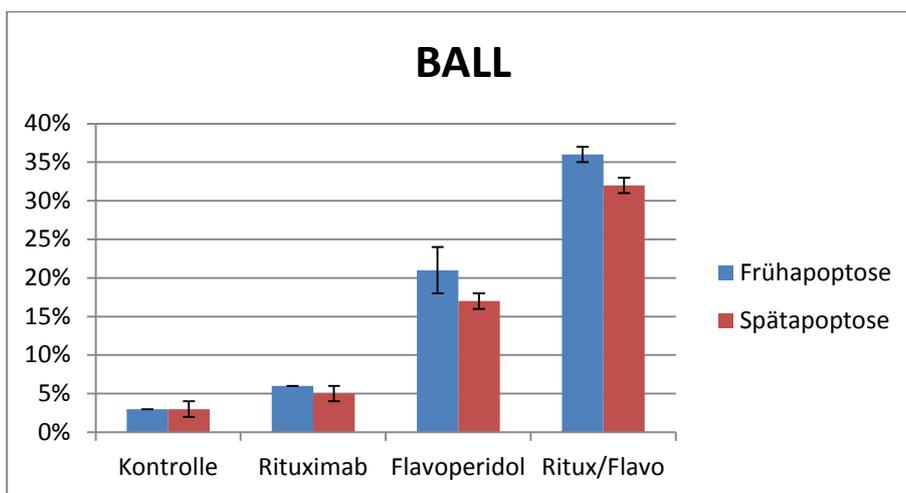
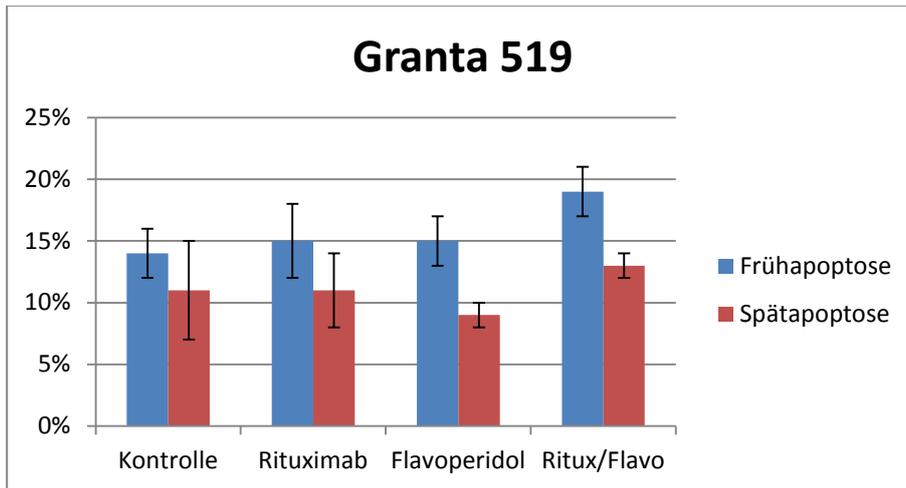


Abb.16 Früh- und Spätapoptose in den Zelllinien Granta-519 und BALL-1 unter der Behandlung mit Flavopiridol und Rituximab als Monotherapie und in Kombination sowie der unbehandelten Kontrollen.. Flavo: Flavopiridol; Ritux: Rituximab.

4.4.3.3 Rituximab und Flavopiridol (Zellzyklus)

Anschließend wurde der Zellzyklus unter Gabe von Rituximab und Flavopiridol in den Zelllinien Granta-519 und BALL-1 untersucht (Abb.17).

In der Zelllinie Granta-519 wurde kein G1-Block beobachtet sowie keine nennenswerte Verschiebungen in der S-Phase oder der G2-Phase.

In der Zelllinie BALL-1 kam es auch zu keinen G1-Block. Interessanterweise war die Zellzahl in der G1-Phase nach Behandlung mit Flavopiridol sogar vermindert. Dafür wurde aber eine Zunahme der Zellen in der S-Phase beobachtet. Sie nahm von 11% unter der Therapie mit Flavopiridol auf 19% unter der Kombination mit Rituximab im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu.

ERGEBNISSE

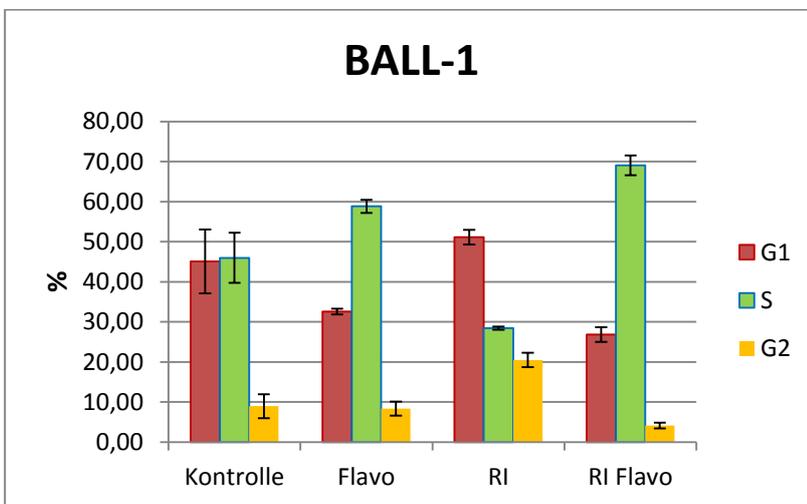
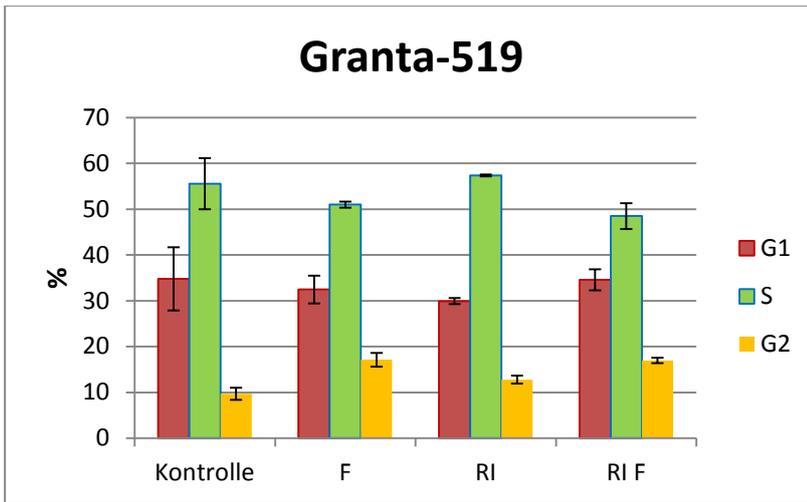


Abb.17 Zellzyklus in den Zelllinien Granta-519 und BALL-1. Die Zellzyklus-Phasen sind farbkodiert:rot-G1-Phase; grün:-S Phase gelb- G2 Phase. Auf der y-Achse ist der Prozentsatz (%) dargestellt. Flavo: Flavopiridol; RI: Rituximab.

5 DISKUSSION

5.1 Rituximab

Die Einführung des monoklonalen Antikörpers Rituximab stellt einen der wichtigsten Fortschritte in der Therapie von lymphoproliferativen Erkrankungen in den letzten 30 Jahren dar. In der klinischen Praxis verbesserten sich dadurch signifikant das Ansprechen und die Überlebensraten den Patienten mit aggressiven und indolenten Non-Hodgkin-Lymphomen, speziell DLBCL, FL, MCL, aber auch CLL. Außerdem ist Rituximab zugelassen zur Therapie von Autoimmunerkrankungen, z.B. der thrombotisch-thrombozytopenische Purpura und der rheumatoiden Arthritis.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Wirkung einer Rituximab-Monotherapie in vier MCL-Zelllinien und einer ALL-Zelllinie. Am empfindlichsten waren die MCL-Zelllinie Rec-1 und die Kontrollzelllinie BALL-1. Es kam zu einer Verringerung der vitalen Zellen auf ca. 60%- 70% der unbehandelten Zellen. Die Zelllinie Granta-519 wies eine mittlere Sensitivität auf (ca. 80%). Die anderen zwei MCL-Zelllinien Jeko-1 und Z-138 waren *in vitro* weitgehend unempfindlich zu Rituximab.

Stolz et al. beobachteten eine ähnliche *in vitro* Resistenz von manchen Lymphomen auf Rituximab. Die Gruppe zeigte außerdem, dass Rituximab-Resistenz mit einer Überexpression von Bcl-xL in Lymphom-Zelllinien assoziiert ist. Diese Zelllinien in der Studie waren resistent auf dem Rituximab-induzierten Zelltod. Die Resistenz konnte man überwinden, indem man das BH3-Mimetikum ABT-737 zusammen mit Rituximab applizierte (Stolz et al., 2008). Passend zu diesen Ergebnissen konnten wir in unseren Untersuchungen keine Apoptose-Induktion in den resistenten Zelllinien beobachten.

Als nächstes untersuchten wir die sensitiven Zelllinien bezüglich der Empfindlichkeit auf Rituximab in der Gegenwart vom humanen Serum. Ziel der Untersuchung war zu überprüfen, ob die Wirkung von Rituximab durch Anschalten eines zusätzlichen Wirkmechanismus, nämlich der Aktivierung des Komplementsystems, gesteigert werden kann. Sowohl in der MCL-Zelllinie Rec-1 als auch in der Kontrollzelllinie BALL-1 konnte keine Steigerung der Wachstum-Inhibition durch Zugabe des humanen Serums zu Rituximab gesehen werden. Bei den beiden Zelllinien war die Anzahl der vitalen Zellen nach Behandlung mit Rituximab unabhängig von der Zugabe vom humanen Serum vergleichbar. Es gibt verschiedene Erklärungen bezüglich die Rituximab-Resistenz auf das Komplementsystem.

Golay et al. zeigten, dass bestimmte Oberflächen-Moleküle, z.B. CD 55 und CD 59 auf FL Rituximab-Resistenz verursachen können. Nach einer Blockade der CD 55- und CD 59-Funktion mit spezifischen Antikörpern konnte die komplementassoziierte Zytotoxizität (CDC) gesteigert werden (Golay et al., 2000). Andere Studiengruppe bestätigen, dass die CD 59-Expression mit einer Rituximab-Resistenz assoziiert ist (Treon et al., 2001). In Gegensatz dazu wiesen die Ergebnisse zwei anderer Arbeitsgruppen daraufhin, dass die Komplement-Inhibitoren CD 55 und CD 59 das Ansprechen zu der Rituximab-Therapie nicht beeinflussen (Weng and Levy, 2001, Bannerji et al., 2003). Bannerji et al. zeigten, dass der entscheidende Prädiktor für das Rituximab-Ansprechen die Mcl-1 /Bax Ratio ist (Bannerji et al., 2003).

Racila et al. demonstrierten einen anderen Zusammenhang zwischen Rituximab-Effektivität und Komplementsystem. Sie untersuchten 133 Patienten mit FL auf C1q-Polymorphismen. Es wurde gezeigt, dass die Expression vom A-Allel (das zu einem niedrigerem C1q-Niveau führt) mit einem verlängerten Rituximab-Ansprechen korreliert im Gegensatz zum G-Allel, das mit einem erhöhtem C1q-Niveau assoziiert ist. Durch das hohe C1q-Niveau kommt es zu Opsonierung und gesteigertes Clearance der apoptotischen Tumorkörper, was zu einer verminderten zellulären und humoralen Immunantwort bzw. zu kürzerem Progression-freien Überleben führt (Racila et al., 2008).

In vielen präklinischen Studien wurde gezeigt, dass die in vitro Wirkung von Rituximab als Monosubstanz begrenzt ist. Dagegen lag das klinische Ansprechen bei 40%-50% bei den NHL (Maloney et al., 1997, McLaughlin et al., 1998, Coiffier et al., 1998).

5.2 Rituximab und Zytostatika (Fludarabin oder Mitoxantron)

Klinisch zeigt sich der wesentliche Erfolg von Rituximab in der Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika. Verschiedene Gruppen berichteten über eine Verbesserung des Gesamtansprechens, der Komplettremissionen und des Gesamtüberlebens bei niedrigmalignen NHL und neudiagnostizierten DLBCL (Marcus et al., 2005, Hiddemann et al., 2005, Herold et al., 2007, Coiffier et al., 2002).

In unserer Studie untersuchten wir die genaue Wirksamkeit von Rituximab in Kombination mit bestimmten konventionellen Chemotherapeutika und neueren molekularen Substanzen hinsichtlich der additiven, synergistischen oder antagonistischen Effekte.

Der Effekt der Kombination von Rituximab mit Fludarabin sowie mit Mitoxantron zeigte sich in den Trypanblau-Analysen in allen Zelllinien als additiv. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch in

DISKUSSION

den Apoptose-Analysen.

In vitro Studien zeigten synergistische Effekte bei der Kombination von Fludarabin und Rituximab in NHL und B-CLL (Alas et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse in MCL aber nicht bestätigt werden. In allen drei Zelllinien wurden lediglich additiven Effekte beobachtet. Ferrer et al. zeigte hohe zytotoxische Wirkung von Mitoxantron durch Apoptose-Induktion in den MCL-Zelllinien Rec-1 und Granta-519 (Ferrer et al., 2004). Dieser Effekt wurde auch in unserer Arbeit beobachtet. Bei Rec-1 wurden eine Frühapoptose von 44% und eine Spätapoptose von 22% nach der Behandlung mit Mitoxantron beobachtet. In der Kombination mit Rituximab stieg die Frühapoptose auf 48% an, was allerdings weiterhin einem additiven Effekt entspricht.

Die klinischen Ansprechraten auf einer Fludarabin-Monotherapie sowie der Effekt von Rituximab als Monosubstanz in Patienten mit MCL sind moderat (Foran et al., 2000, Ghielmini et al., 2000). Forstpointner et al. untersuchten die Kombination von Rituximab und Fludarabin-haltige Chemotherapien in Patienten mit rezidivierten und refraktären MCL und zeigten, dass durch die Zugabe von Rituximab zu FCM (Fludarabin, Cyclophosphamid, Mitoxantron) die Ansprechraten signifikant gesteigert (58% vs. 46%; CR 29% vs. 0%) und das Gesamtüberleben verlängert wurden (Forstpointner et al., 2004). Diese deutlich höhere Wirksamkeit kommt zustande durch die Kombination von Fludarabin und Mitoxantron mit Cyclophosphamid. Diese Daten weisen eindeutig darauf hin, dass die Kombination von Rituximab und FCM eine effektive Salvage-Therapie für rezidivierte folliculäre und Mantelzell-Lymphome darstellt.

In der Arbeit von Rule et al. wurde sogar gezeigt, dass die Addition von Rituximab zu Fludarabin und Cyclophosphamid das Gesamtüberleben bei Patienten mit neu diagnostizierten MCL signifikant verbessert (von 27 zu 44,5 Monate ($P=0,005$)) (Rule et al., 2016).

Emmanouilides et al. kombinierten Rituximab mit Mitoxantron und Cyclophosphamid bei Patienten mit indolenten NHL. Die Ansprechrate lag bei 92%. Von 27 Patienten erreichten 20 Patienten eine Komplettremission und 5 Patienten erreichten eine partielle Remission. (Emmanouilides et al., 2000).

McLaughlin et al. berichteten über eine gute Verträglichkeit der Kombination von Rituximab mit Fludarabin, Mitoxantron und Dexamethason bei Patienten mit rezidivierten indolenten NHL. (McLaughlin et al., 2000).

In einer internationalen Phase III Studie mit 560 Patienten zeigte das Europäische MCL-Netzwerk,

dass die Patienten, die sechs Zyklen R-FC erhielten, ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben aufweisen, als die Patienten, die acht Zyklen R-CHOP erhielten (Kluin-Nelemans et al., 2012). Deshalb wird das R-FC Regime aktuell nicht mehr als Primärtherapie empfohlen.

Unter den konventionellen Chemotherapeutika erwies sich R-CHOP somit als Therapie der ersten Wahl bei MCL.

Rituximab hat eine wesentliche Rolle nicht nur in der Kombination mit den konventionellen Chemotherapien, sondern auch als Erhaltungstherapie. Nach effektiver initialer Tumorreduktion nach R-FCM Regime zeigten Forstpointner et al. eine deutliche Verlängerung des progressionsfreien Überlebens durch die Rituximab-Erhaltungstherapie. Dabei nahm das progressionsfreie Überleben nach zwei Jahren von 10% auf 45% zu. (Forstpointner et al., 2006). Kluin-Nelemans et al. zeigten eine deutliche Verlängerung des Gesamtüberlebens durch Rituximab-Erhaltungstherapie bei Patienten mit MCL, die initial nach der R-CHOP-Schema therapiert wurden (Kluin-Nelemans et al., 2012).

5.3 Rituximab und molekulare Substanzen

Als weiterer Schwerpunkt wurden in dieser Arbeit neuere Substanzen und deren Interaktion mit Rituximab untersucht.

5.3.1 Rituximab und Bortezomib

Rituximab inhibiert den NF- κ B-Signalweg, indem er die Phosphorylierung von Komponenten in diesem Signalweg herunterreguliert und die I κ B-Kinase Aktivität inhibiert (Jazirehi et al., 2005). NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der verschiedene anti-apoptotische Gene wie z.B. Bcl-xL reguliert. NF- κ B kann auch die Funktion von p53 antagonisieren und induziert Zellwachstum durch Bindung an die Promotor-Region von Cyclin D (Lopes et al., 1997, Bogner et al., 2003).

Bortezomib bewirkt auch über den NF- κ B-Signalweg eine Kaspase-Aktivierung. Über diese Mechanismen, kaspaseabhängig und kaspaseunabhängig, beeinflussen beide Medikamente den NF- κ B-Signalweg, was einen additiven Effekt dieser Kombination erwarten lässt.

Diese Effekte bestätigten sich in dieser Arbeit. Es zeigte sich, dass die Kombination von Rituximab und Bortezomib in allen Zelllinien additiv war, wobei Granta-519 besonders empfindlich war. In den Apoptosen-Analysen zeigte sich entsprechend der diskutierten Wirkmechanismen auch eine

DISKUSSION

gesteigerte Apoptose-Induktion.

In der Arbeit vom Rieken wurde eine hohe Wirksamkeit von Bortezomib in MCL-Zelllinien gezeigt. Die Zelllinien Granta-519, HBL-2, Rec-1, Jurkat und Karpas 422 waren mit IC₅₀-Werten um 25±5 nM intermediär empfindlich, dagegen war Jeko-1 deutlich empfindlicher auf Bortezomib (Rieken, 2010). Die Zelllinie NCEB-1 war weitgehend refraktär. Die Heterogenität der MCL-Zelllinien bestätigt sich auch in unserer Arbeit. Die Empfindlichkeit der Zelllinie Granta-519 gegenüber Bortezomib war sehr ausgeprägt und bereits nach 48h nach Therapie waren nur 11% der Zellen vital. Im Gegensatz dazu zeigte sich unter der Behandlung der Zelllinie Rec-1 mit Bortezomib keine Wachstumshemmung. Die Kontrollzelllinie BALL-1 zeigte eine mittlere Sensibilität.

Die unterschiedliche Empfindlichkeit der MCL-Zelllinien wurde auch in der Arbeit von Alinari et al. beobachtet, in der ebenfalls eine erhöhte Apoptose-Induktion durch Reduktion der NFκB-Level unter der Behandlung mit Rituximab und Bortezomib gezeigt wurde. Hier zeichnete sich die Zelllinie SP53 als sehr sensitiv aus (nur 13% vitale Zellen nach 24h) und die Zelllinie Jeko-1 war am wenigsten sensitiv (55% vitale Zellen nach 24h) (Alinari et al., 2009). Wichtiger Unterschied im Vergleich zu unserer Arbeit waren die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen (die Bortezomib-Konzentration war in der Arbeit von Alinari et al. ca. doppelt so hoch).

Goy et al. untersuchten die Wirkung von Bortezomib als Monotherapie in Patienten mit rezidivierten oder refraktären Mantelzelllymphomen. Der Follow-up war 26,4 Monate. Die Ansprechrate lag bei 32% mit allerdings nur 8% Komplettremissionen. Die Dauer des Ansprechens betrug im Median 9,2 Monaten und das mediane Gesamtüberleben lag bei 23,5 Monaten. Die Hauptnebenwirkungen waren Neuropathie (13%) und Lymphopenie 67% (Goy et al., 2009).

Bortezomib wurde auch in Kombination mit anderen Chemotherapeutika erforscht. Ruan et al. untersuchten die Interaktion zwischen Bortezomib und der Standardchemotherapie R-CHOP in Patienten mit primär unbehandelten MCL und DLBCL. In DLBCL lag die Ansprechrate bei 100% und in 86% der Patienten wurde eine Komplettremission beobachtet. Das Gesamtüberleben lag nach zwei Jahre bei 70%. Die Ansprechrate bei den Patienten mit MCL betrug 91%. 72% der Patienten waren in Komplettremission und das Gesamtüberleben nach zwei Jahre lag bei 86% (Ruan et al., 2011).

Weigert et al. untersuchten eine Kombination von Bortezomib, Rituximab, Hochdosis Cytarabin und Dexamethason bei Patienten mit refraktären oder rezidivierenden MCL. Die Ansprechrate lag bei 50% und die Komplettremission 25%. Das progressionsfreie Überleben betrug 5 Monate und das

DISKUSSION

Gesamtüberleben 15,5 Monate. Das sind sehr gute Ergebnisse, wenn man die Tatsache berücksichtigt, dass die Patienten bereits mehrfach vorbehandelt waren. Allerdings handelt es sich um ein kleines Studienkollektiv von nur acht Patienten. Die Hauptnebenwirkungen in dieser Studie waren Hämatotoxizität Grad III/IV und Polyneuropathie Grad III (Weigert et al., 2009).

Eine andere kleine Studie untersuchte die Kombination von Bortezomib, Rituximab und Bendamustin in Patienten mit refraktären oder rezidivierenden MCL und follikulären Lymphomen. Die Ansprechrate in den Patienten mit MCL lag bei 71% und in den Patienten mit follikulärem Lymphom bei 93%. Bei dieser Kombination ist zu achten, dass häufig schwere Nebenwirkungen beobachtet wurden, z.B. eine Sepsis Grad V in einem Patienten. 47% der Patienten entwickelten eine Neuropathie (17% Grad III oder IV). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die wöchentliche Gabe von Bortezomib die Rate der Neuropathie deutlich vermindert (de Vos et al., 2009). Andere Nebenwirkungen Grad I-II waren Übelkeit (50%), Fatigue (47%), Obstipation (40%), und Fieber (40%) (Friedberg et al., 2011).

Die Therapie mit Rituximab und Bortezomib wurde von Baiocchiet al. in Patienten mit rezidivierten und refraktären FL und MCL untersucht. Das Gesamtansprechen der MCL-Patienten betrug 29% (Baiocchi et al., 2011). Bessere Ergebnisse berichteten Lamm et al., für die Kombination von Bortezomib und Rituximab mit Dexamethason in therapierefraktären MCL-Patienten (Gesamtansprechen 81,3%, Komplettremission 43,8%). Allerdings handelt es sich hier um eine relativ kleine Studie (Lamm et al., 2011).

Furtado et al. zeigten, dass der Zusatz von Bortezomib zu der Standardchemotherapie CHOP das Gesamtansprechen im Vergleich zu alleiniger CHOP-Therapie (47,8% CHOP bzw. 82,6% CHOP-Bortezomib) signifikant verbessert. Die Rate von Komplettremissionen lag bei 21,7% (CHOP) vs. 34,8% (CHOP-Bortezomib). Das mediane Gesamtüberleben betrug 11,8 Monate nach der Therapie mit CHOP im Vergleich zu 35,6 Monate nach CHOP-Bortezomib (Furtado et al., 2015).

Vielversprechende Ergebnisse zeigt Robrak in einer Phase-III-Studie mit 487 Patienten, in der die Rolle von Bortezomib in der Therapie von neudiagnostizierten MCL untersucht wurde. Er verglich R-CHOP mit VR-CAP (bei diesem Regime wird Vincristin durch Bortezomib ersetzt). In der VR-CAP-Gruppe lag das mediane progressionsfreie Überleben bei 24,7 Monaten versus 14,4 Monaten in der R-CHOP-Gruppe (Robak et al., 2015). Allerdings war das progressionsfreie Überleben der R-CHOP-Gruppe deutlich kürzer als die publizierte Daten von Rummel et.al (31,2 Monate nach R-CHOP) (Rummel et al., 2013). Der Unterschied im Gesamtüberleben war nicht signifikant. Während in den USA Bortezomib als Monotherapie zugelassen ist, suggerieren unsere Daten ein

Vorteil für die Kombination mit Rituximab. Diese präklinischen Daten werden durch diese randomisierten Studie nachdrücklich bestätigt (Robak et al., 2015).

5.3.2 Rituximab und Everolimus (Rad 001)

In der Untersuchung von Everolimus (Rad 001) in Kombination mit Rituximab zeigten sich in der Trypanblau-Analyse ein additiver Effekt in der Zelllinie Rec-1 und ein antagonistischer Effekt in den Zelllinien Granta-519 und BALL-1. Das konnte auch in den Zellzyklus-Analysen eindeutig bestätigt werden.

In Rec-1 wurde ein G1-Block beobachtet. In den unbehandelten Proben befanden sich 46% der Zellen in der G1-Phase und unter einer Behandlung mit Everolimus (Rad 001) stieg der Anteil der Zellen in der G1-Phase auf 53%. In der Kombination von Rituximab und Everolimus (Rad 001) bestand der G1-Block fort.

Im Gegensatz dazu wurde in der Zelllinie Granta-519 keinen G1-Block beobachtet. In den Apoptose-Analysen zeigte sich auch keine Steigerung der Apoptose. Alle diese Ergebnisse belegen den Antagonismus zwischen den beiden Substanzen in dieser Zelllinie.

In BALL-1 zeigte sich ein G1-Block, der aber durch die Kombination von Rituximab und Everolimus (Rad 001) aufgehoben wurde.

Diese Erkenntnisse zeigen die Heterogenität der MCL-Zelllinien und somit die komplexen Zusammenhänge in der molekularen Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms.

Everolimus (Rad 001) verursacht somit einen G1-Block. Diesen Wirkmechanismus kann man sich für neue Therapiekonzepte zunutze machen, indem Everolimus (Rad 001) mit Medikamenten, die in der G1-Phase angreifen, kombiniert wird.

In den Apoptose-Analysen dieser Arbeit zeigte sich wie erwartet keine nennenswerte Apoptose. Diese Beobachtungen bestätigen die Arbeit von Hipp et al., dessen Arbeitsgruppe ebenfalls eine Zellzyklusinhibition des mTOR-Inhibitors Rapamycin in drei MCL-Zelllinien NCEB-1, Jeko-1 und Granta-519 nachweisen konnte (Hipp et al., 2005).

Die antiproliferative Wirkung von RAD001 in Mantelzell-Lymphom-Zelllinien wurde 2007 von einer in vitro Studie von Haritunians et al. untersucht (Haritunians et al., 2007). Everolimus (Rad 001) inhibierte die Proliferation in den MCL Zelllinien Jeko 1, SP49 und NCEB1 um ca. 40- 65% im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Dieser Effekt war assoziiert mit einem G1-Block und

DISKUSSION

einer reduzierten Phosphorylierung von 4E-BP1. Die Kombination mit Rituximab zeigt nur in einer MCL Zelllinie, SP49, einen antiproliferativen Effekt. In den anderen Zelllinien, Jeko1 und NCEB1, wurde kein Effekt der Kombination von Everolimus (Rad 001) und Rituximab beobachtet.

In einer Phase I/II Studie, die den Effekt von Everolimus (Rad 001) in Patienten mit hämatologischen Erkrankungen untersuchte, sprach keiner der vier Patienten mit MCL auf Everolimus (Rad 001) an (Yee et al., 2006). Dass viele von den Patienten kein Ansprechen auf Everolimus (Rad 001) zeigen, weist darauf hin, dass Resistenzmechanismen bestehen oder im Verlauf der Behandlung entstehen können. Einige dieser Mechanismen konnten in der Untersuchung von Rosich et al. näher charakterisiert werden (Rosich et al., 2012). Die Ergebnisse der Studie belegen, dass durch Inhibition der Autophagie die Resistenz auf Everolimus (Rad 001) überwunden werden kann. Die Autophagie ist ein selbstschützender Mechanismus der Zelle, der für die Aufrechterhaltung der Homöostase des intrazellulären Metabolismus sorgt (White and DiPaola, 2009). Dieser Überlebensmechanismus wird von Tumorzellen genutzt, um den metabolischen Stress durch Chemotherapien zu tolerieren (Amaravadi et al., 2007, Kovacs et al., 2012). In der Arbeit von Rosich wurde gezeigt, dass es nach prolongierter Exposition (48h-72h) mit Everolimus (Rad 001) zu einer Rephosphorylierung von Akt kommt, was zu einer Resistenzbildung gegenüber Everolimus (Rad 001) führt. Nach Zugabe des Akt-Inhibitors Akti-1/2 kann die Resistenz auf Everolimus (Rad 001) in primär empfindlichen Zelllinien aufgehoben werden, nicht aber in unempfindlichen Zelllinien. Durch eine Ausschaltung der Autophagiegene ATG7, ATG5 und ATG3 sowie eine Vorbehandlung mit dem Autophagieinhibitor Hydrochloroquin konnte man die Resistenz auf den Akt/mTOR-Inhibitor auch in den resistenten Zelllinien überwunden werden, was zu einer mitochondrialer Apoptose führt.

Die Effektivität von Everolimus (Rad 001) wurde auch in einer klinischen Phase II-Studie untersucht. Witzig et al. untersuchten den Effekt von Everolimus (Rad 001) als Monotherapie in rezidivierten und refraktären NHL. Das Gesamtansprechen in den Patienten mit MCL lag bei 32%, in denen mit diffus großzelligen NHL bei 30% und in den Patienten mit follikulärem Lymphom bei 38%. Auf den ersten Blick zeigen diese Ergebnisse eine moderate Wirksamkeit. Allerdings handelt es sich beim Studienkollektiv um ältere Patienten (medianes Alter von 70 Jahren) mit rezidivierten aggressiven Lymphomen, die bereits mehrmals vorbehandelt worden waren. 32% der Patienten hatten eine Stammzelltransplantation erhalten. (Witzig et al., 2011).

In einer Studie, in der DLBCL-Zelllinien auf die Interaktion von Rituximab und Everolimus (Rad 001) untersucht worden sind, zeigten sich synergistische Effekte bzgl. eines Zellzyklusarrest sowie der Apoptose-Induktion (Xu et al., 2014).

Everolimus (Rad 001) ist als orales Therapeutikum verfügbar und hat insgesamt ein gutes Nebenwirkungsprofil. In einer Studie, in der 36 Patienten mit MCL eingeschlossen worden sind, zeigte sich ein Gesamtansprechen von 20%, mit zwei Komplettremissionen und fünf Partialremissionen (Renner et al., 2012). Die Hauptnebenwirkungen Grad > III waren hämatologischer Natur und wurden in 5% der Patienten beobachtet (11% Anämie, 11% Thrombozytopenie und 8% Neutropenie). Unter den nicht hämatologischen Nebenwirkungen standen Fatigue, orale Mucositis, Rash, Pruritus, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Diarrhö und Pneumonitis in Vordergrund.

Schreiber et al. untersuchten Everolimus (Rad 001) als Erhaltungstherapie in Patienten mit MCL, die für eine intensiviertere Therapie nicht geeignet waren. Das Nebenwirkungsprofil von Everolimus (Rad 001) wurde schlecht toleriert, sodass keiner von den Patienten die geplante Studiendauer von 24 Monaten vollenden konnte und die Studie frühzeitig abgebrochen wurde (Schreiber et al., 2015).

Da es in unserer Arbeit bei zwei von drei Rituximab sensitiven Zelllinien ein eindeutiger Antagonismus beobachtet wurde, erklärt die Ergebnisse der o.g. Studien. Daher sollte eine Kombinationstherapie von Rituximab und Everolimus (Rad 001) bei MCL eher zurückhaltend eingeschätzt werden.

Auf der anderen Seite zeigten Ansell et al., dass die Kombinationstherapie des mTOR-Inhibitors Temsirolimus und Rituximab in Patienten mit rezidivierten und refraktären MCL eine Komplettremission von 19% und eine Partiellremission von 41% erzielen kann. Das sind ermutigende Ergebnisse, die darauf hinweisen, dass einige mTOR-Inhibitoren in Kombination mit Rituximab eine wichtige Rolle in der Therapie der rezidivierten und refraktären MCL spielen könnten (Ansell et al., 2011).

5.3.3 Rituximab und Flavopiridol

Flavopiridol ist CDK-Inhibitor, der Apoptose und Zellzyklus-Arrest in MCL induziert. (Venkataraman et al., 2006).

Weiglein untersuchte den Effekt von Flavopiridol auf MCL-Zelllinien, wobei sich Jeko-1 als sensitive Zelllinie (42% vitale Zellen nach 24h; 39% nach 48h) und Granta-519 als unempfindlich (81%; 91%) in den Trypanblau-Messungen zeigten. In den Zellzyklus-Analysen kam es in Granta-519 zu einem geringen G1/S-Block und praktisch zu keinem G2/M-Arrest (Weiglein, 2012). In unserer Arbeit zeigten sich ähnlichen Ergebnisse. Die Zelllinie Granta-519 zeigte eine mittlere Sensitivität auf Rituximab und Flavopiridol, wobei in der Kombinationstherapie ein eindeutiger

DISKUSSION

Antagonismus beobachtet wurde. Jeko-1 war nicht empfindlich auf Rituximab, sodass in dieser Zelllinie die Kombinationstherapie mit anderen Medikamenten nicht untersucht wurde. In den Apoptose-Analysen zeigte sich in Granta-519 wie zu erwarten kein nennenswerter Apoptose-Anstieg. In den Zellzyklus-Analysen wurde kein G1-Block beobachtet sowie keine nennenswerte Verschiebungen in der S-Phase.

Bei den Trypanblau-Messungen zeigten sich unter der Kombination von Rituximab und Flavopiridol additive Effekte in den Zelllinien Rec-1 und BALL-1. Das spiegelte sich auch in den Apoptose-Analysen wieder. In BALL-1 wurde sowohl eine Vermehrung der frühapoptotischen als auch der spätapoptotischen Zellen unter der Kombination der beiden Medikamente beobachtet. Im Zellzyklus kam es zu keinem G1-Block. Über einen G1/S Arrest und gesteigerte Apoptose bei der MCL-Zelllinie Jeko-1 wurde in den Arbeiten von Weiglein und Venkataraman berichtet (Weiglein, 2012, Venkataraman et al., 2006). Dieser Effekt konnte in unserer Arbeit nicht bestätigt werden.

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen wird ersichtlich, dass die Induktion eines Zellzyklusarrests oder Apoptose in direkten Zusammenhang mit der individuellen Empfindlichkeit der Zellen auf Flavopiridol steht.

Im Jahr 2003 wurde die Wirkung von Flavopiridol als Monotherapie in Patienten mit unbehandelten und rezidivierten Mantelzelllymphomen getestet (Kouroukis et al., 2003). Dabei zeigte sich eine moderate Aktivität von Flavopiridol. Es wurde keine Komplettremission beobachtet. Die Rate der Partiellremission lag bei 11% und bei 71% der Patienten kam es zu einer stable disease. In 18% der Patienten kam es zur Progression der Erkrankung. Die Dauer des Ansprechens betrug nur 3,3 Monate. Die Hauptnebenwirkungen waren Diarrhoe, Übelkeit, Erbrechen und Fatigue. Die hämatologische Toxizität war moderat. Diese am Anfang enttäuschenden Ergebnisse erklären sich dadurch, dass das benutzte Applikationsschema direkt von den in vitro Versuchen abgeleitet wurde. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität von Flavopiridol für das in vitro verwandte Kalbserum viel niedriger ist als im humanen Serum (Byrd et al., 1998).

Entsprechend führte ein optimiertes Applikationsschema zu deutlich besseren Ergebnissen. Jones et al. behandelten in einer kleinen Studie Patienten mit NHL mit Flavopiridol (Jones et al., 2013). Das Gesamtansprechen lag bei 26%, mit 14% partiellen Remissionen. Trotzdem war die klinische Aktivität von Flavopiridol als Monotherapie eingeschränkt. Die Dauer des Ansprechens betrug nur 6 Monate.

In einer Phase I-Studie wurde ein klinischer Benefit (26%) mit der Behandlung mit Flavopiridol von refraktären und rezidivierenden NHL-Patienten erzielt, darunter MCL-Patienten (Jones et al.,

DISKUSSION

2014). Nach 6 Zyklen der Therapie erreichten 14% der Patienten partielle Remission. Die geschätzte mittlere Dauer des Ansprechens betrug ca. 6 Monate.

Vielversprechende Ergebnisse zeigten sich für die Kombination von Flavopiridol mit Rituximab und Fludarabin. In einer Studie, die Patienten mit MCL, indolente B-NHL und CLL eingeschlossen hat, zeigte sich ein Gesamtansprechen von 82% mit 50% Komplettremission (Lin et al., 2010). Bei 80% der Patienten handelte es sich um MCL. Alle MCL-Patienten wiesen ein niedriges Risiko auf (MIPI Index). Das mediane progressionsfreie Überleben in dieser Studie lag bei 25,6 Monaten. Bemerkenswert ist, dass das mediane progressionsfreie Überleben der Patienten mit klassischem MCL bei 35,9 Monate lag. In dieser Studie wurde eine deutliche Hämatotoxizität beobachtet mit 68% Leukopenie Grad 3-4 (26% Infektionen), 61% Anämie und 45% Thrombozytopenie, die aber gut beherrschbar waren. Diese signifikante Hämatotoxizität schränkt den klinischen Einsatz dieser Kombinationstherapie allerdings in älteren Patienten ein.

In einer anderen Phase 1-Studie wurde ein Gesamtansprechen in 44% in Patienten mit rezidierten oder refraktären B-Zellneoplasmen, inklusive MCL beobachtet, bei der Flavopiridol und Bortezomib kombiniert wurde (Holkova et al., 2011). Der synergistische Effekt von beiden Substanzen ist dadurch zu erklären, dass sowohl Flavopiridol als auch Bortezomib das NF- κ B Signalweg inhibieren (Takada and Aggarwal, 2004).

Stephens et al. zeigten in einer kleinen Studie mit 9 Patienten mit Hochrisiko CLL vielversprechende Ergebnisse mit der Kombination von Rituximab, Flavopiridol und Cyclophosphamid (Stephens et al., 2013). Sieben von neun Patienten sprachen an, davon drei mit einer Komplettremission, ein Patient hatte eine stable disease und nur in einem Patienten schritt die Krankheit fort.

Unsere Ergebnisse belegen ebenfalls, dass die Kombinationstherapie von Rituximab und Flavopiridol eine gute Behandlungsoption für die Therapie von rezidierten MCL darstellen könnte.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Da das Mantelzelllymphom durch seine schlechte Prognose charakterisiert ist, ist es wichtig die Aktivität von neuen Substanzen zu prüfen, um die zukünftigen Therapieoptionen zu verbessern. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von Rituximab mit einzelnen konventionellen Chemotherapeutika sowie molekularen Substanzen überprüft.

Die einzelnen Kombinationen von Rituximab mit Fludarabin, Mitoxantron, sowie mit Bortezomib zeigten additive Effekte bei allen Zelllinien. Dieser Wirkmechanismus ist auf die gesteigerte Apoptose-Induktion zurückzuführen, wenn diese Substanzen mit Rituximab kombiniert werden. Diese Ergebnisse suggerieren, dass Kombinationstherapien auch von Vorteil für die klinische Behandlung von MCL sind.

Auch bei der Kombinationstherapie von Rituximab und Everolimus (Rad 001) zeigten sich zum Teil additive und zum Teil antagonistische Effekte. In den Apoptosen-Analysen wurden keine nennenswerten Veränderungen beobachtet. Diese Ergebnisse sind auf Veränderungen im Zellzyklus zurückzuführen. So konnte bei den Zelllinien mit additiven Effekten einen G1-Block im Zellzyklus beobachtet werden. Im Gegensatz dazu kam es bei den Zelllinien mit antagonistischen Effekten zu keinem G1-Block bzw. der von Everolimus (Rad 001) induzierte G1-Block wurde in der Kombinationstherapie mit Rituximab aufgehoben. In der Zusammenschau der o.g. Ergebnisse ist die Empfehlung für die Kombinationstherapie von Rituximab und Everolimus (Rad 001) bei MCL zurückhaltend zu bewerten. Allerdings zeigte sich in der Literatur, dass die Kombinationstherapie von einem anderen mTOR-Inhibitor, Temsirolimus, und Rituximab in Patienten mit rezidivierten und refraktären MCL von Vorteil sein kann.

Bei der Kombinationstherapie von Rituximab und Flavopiridol wurden zum Teil additive und zum Teil antagonistische Effekte beobachtet. Bei den additiven Effekten zeigte sich ebenfalls gesteigerte Apoptose-Induktion. Bei den antagonistischen Effekten wurde dagegen keine erhöhte Apoptose beobachtet, aber auch keine nennenswerten Änderungen in den Zellzyklus-Analysen. Um jedoch die Mechanismen des beobachteten Antagonismus in einigen Zelllinien näher zu charakterisieren, sind weitere Untersuchungen benötigt.

7 ABKÜRZUNGEN

4EBP1	eukaryotischen Elongationsfaktor 4E Bindungsprotein 1
ADCC	antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (antibody-dependent cellmediatedcytotoxicity)
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
Akti-1/2	Proteinkinase B-Inhibitor 1/2
AML	akute myeloische Leukämie
ATM	Ataxie-Teleangiektasie-Mutation
ATCC	American Type Culture Collection
ATG	Autophagiegen
Bax	Bcl-2 associated x protein
Bcl-1	B-cell-lymphoma 1
Bcl-2	B-cell-lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell leukemia/lymphoma x L
BH3	Bcl-2 homolgy 3 domain
BRCA1	Breast Cancer 1
CCL	chronisch lymphatische Leukämie
CD	cluster of differentiation
CDC	Komplement-vermittelte Zytotoxizität (complement-dependent cytotoxicity)
CDK	cyclin-dependent kinase
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon
CHVP- α INF	Cyclophosphamid, Adriamycin, Etoposid und Prednisolon plus interferon-alpha2a
CVP	Cyclophosphamid, Vincristin und Prednisolon

Abkürzungen

D	Deutschland
DHAP	Dexamethason, Ara-C und Cisplatin
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2F	E2-Promotor Binding Factor
EBV	Epstein-Barr-Virus
ERK1/2	extracellular receptor kinase
EU	Europäische Union
FACS	Durchflusszytometrie (Fluoreszenz Activated Cell Sorter)
FC	Fludarabin und Cyclophosphamid
FCM	Fludarabin, Cyclophosphamid und Mitoxantron
Fc-Region	konstantes Antikörperfragment (fragment constant)
FKS	Fetales Kälberserum
FL	follikuläres Lymphom
FR	Frankreich
Ig G	Immunglobulin G
Ig M	Immunglobulin M
Ig D	Immunglobulin D
Ig H	schwere Immunglobulinkette (immunglobulin heavy chain)
I- κ B	Inhibitor von kappaB
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCL	Mantelzelllymphom (mantle cell lymphom)
Mcl-1	myeloid cell leukaemia 1
MCP	Mitoxantron, Chlorambucil, Prednisolon
MDM2	myeloid cell leukaemia 1
min	Minuten

Abkürzungen

MIPI	Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index
ml	Milliliter
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTOR C1	mammalian target of rapamycin complex 1
mTOR C2	mammalian target of rapamycin complex 2
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NF-κB	nukleärer Faktor-kappaB (nuclear factor-kappa B)
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
nM	nanomolar
p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p38	mitogen-activated protein kinase-Inhibitor
p53	Tumorsuppressor-Gen, lokalisiert auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Rb	Retinoblastom-Protein
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon
R-DHAP	Rituximab, Dexamethason, Ara-C und Cisplatin
REAL	Revised European American Lymphoma
R-FC	Rituximab, Fludarabin und Cyclophosphamid
R-FCM	Rituximab, Fludarabin, Cyclophosphamid und Mitoxantron
R-Hyper-CVAD	Rituximab, Cyclophosphamid, Vincristin, Adriamycin, Dexamethason und Hochdosis Metotrexat und Cytarabin
RNA-se	Ribonukleasen

Abkürzungen

RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
SOX11	sex determining region Y-box 11
SZT	Stammzelltransplantation
US FDA	U.S. Food and Drug Administration
WHO	Weltgesundheitsorganisation

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, J. 2004. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*, **5**, 417-21.
- Alao, J. P. 2007. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer*, **6**, 24.
- Alas, S., Bonavida, B. & Emmanouilides, C. 2000. Potentiation of fludarabine cytotoxicity on non-Hodgkin's lymphoma by pentoxifylline and rituximab. *Anticancer Res*, **20**, 2961-6.
- Alinari, L., Christian, B. & Baiocchi, R. A. 2012. Novel targeted therapies for mantle cell lymphoma. *Oncotarget*, **3**, 203-11.
- Alinari, L., White, V. L., Earl, C. T., Ryan, T. P., Johnston, J. S., Dalton, J. T., Ferketich, A. K., Lai, R., Lucas, D. M., Porcu, P., Blum, K. A., Byrd, J. C. & Baiocchi, R. A. 2009. Combination bortezomib and rituximab treatment affects multiple survival and death pathways to promote apoptosis in mantle cell lymphoma. *MAbs*, **1**, 31-40.
- Amaravadi, R. K., Yu, D., Lum, J. J., Bui, T., Christophorou, M. A., Evan, G. I., Thomas-Tikhonenko, A. & Thompson, C. B. 2007. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest*, **117**, 326-36.
- Ansell, S. M., Tang, H., Kurtin, P. J., Koenig, P. A., Inwards, D. J., Shah, K., Ziesmer, S. C., Feldman, A. L., Rao, R., Gupta, M., Erlichman, C. & Witzig, T. E. 2011. Temsirolimus and rituximab in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: a phase 2 study. *Lancet Oncol*, **12**, 361-8.
- Argyriou, P., Economopoulou, P. & Papageorgiou, S. 2012. The Role of mTOR Inhibitors for the Treatment of B-Cell Lymphomas. *Adv Hematol*, **2012**, 435342.
- Avivi, I. & Goy, A. 2015. Refining the Mantle Cell Lymphoma Paradigm: Impact of Novel Therapies on Current Practice. *Clin Cancer Res*.
- Baiocchi, R. A., Alinari, L., Lustberg, M. E., Lin, T. S., Porcu, P., Li, X., Johnston, J. S., Byrd, J. C. & Blum, K. A. 2011. Phase 2 trial of rituximab and bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell and follicular lymphoma. *Cancer*, **117**, 2442-51.
- Bannerji, R., Kitada, S., Flinn, I. W., Pearson, M., Young, D., Reed, J. C. & Byrd, J. C. 2003. Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic leukemia: relationship to in vivo rituximab resistance. *J Clin Oncol*, **21**, 1466-71.
- Battelli, C. & Cho, D. C. 2011. mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Therapy*, **8**, 359-367.
- Bertoni, F., Rinaldi, A., Zucca, E. & Cavalli, F. 2006. Update on the molecular biology of mantle cell lymphoma. *Hematol Oncol*, **24**, 22-7.
- Bogner, C., Ringshausen, I., Schneller, F., Fend, F., Quintanilla-Martinez, L., Hacker, G., Goetze, K., Oostendorp, R., Peschel, C. & Decker, T. 2003. Inhibition of the proteasome induces cell cycle arrest and apoptosis in mantle cell lymphoma cells. *Br J Haematol*, **122**, 260-8.
- Bonavida, B. 2007. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunoresistance, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene*, **26**, 3629-36.
- Byrd, J. C., Lin, T. S., Dalton, J. T., Wu, D., Phelps, M. A., Fischer, B., Moran, M., Blum, K. A., Rovin, B., Brooker-McEldowney, M., Broering, S., Schaaf, L. J., Johnson, A. J., Lucas, D. M., Heerema, N. A., Lozanski, G., *et al.* 2007. Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **109**, 399-404.
- Byrd, J. C., Shinn, C., Waselenko, J. K., Fuchs, E. J., Lehman, T. A., Nguyen, P. L., Flinn, I. W., Diehl, L. F., Sausville, E. & Grever, M. R. 1998. Flavopiridol induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells via activation of caspase-3 without evidence of bcl-2 modulation or dependence on functional p53. *Blood*, **92**, 3804-16.
- Carlson, B., Lahusen, T., Singh, S., Loaiza-Perez, A., Worland, P. J., Pestell, R., Albanese, C.,

- Sausville, E. A. & Senderowicz, A. M. 1999. Down-regulation of cyclin D1 by transcriptional repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. *Cancer Res*, **59**, 4634-41.
- Chiang, G. G. & Abraham, R. T. 2007. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med*, **13**, 433-42.
- Coiffier, B., Haioun, C., Ketterer, N., Engert, A., Tilly, H., Ma, D., Johnson, P., Lister, A., Feuring-Buske, M., Radford, J. A., Capdeville, R., Diehl, V. & Reyes, F. 1998. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood*, **92**, 1927-32.
- Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., Morel, P., Van Den Neste, E., Salles, G., Gaulard, P., Reyes, F., Lederlin, P. & Gisselbrecht, C. 2002. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, **346**, 235-42.
- Cragg, M. S. & Glennie, M. J. 2004. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood*, **103**, 2738-43.
- Dancey, J. E. 2006. Therapeutic targets: MTOR and related pathways. *Cancer Biol Ther*, **5**, 1065-73.
- de Vos, S., Goy, A., Dakhil, S. R., Saleh, M. N., McLaughlin, P., Belt, R., Flowers, C. R., Knapp, M., Hart, L., Patel-Donnelly, D., Glenn, M., Gregory, S. A., Holladay, C., Zhang, T. & Boral, A. L. 2009. Multicenter randomized phase II study of weekly or twice-weekly bortezomib plus rituximab in patients with relapsed or refractory follicular or marginal-zone B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, **27**, 5023-30.
- Delarue, R., Haioun, C., Ribrag, V., Brice, P., Delmer, A., Tilly, H., Salles, G., Van Hoof, A., Casasnovas, O., Brousse, N., Lefrere, F. & Hermine, O. 2013. CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*, **121**, 48-53.
- Dreyling, M. 2014a. Mantle cell lymphoma: biology, clinical presentation, and therapeutic approaches. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 191-8.
- Dreyling, M., Geisler, C., Hermine, O., Kluin-Nelemans, H. C., Le Gouill, S., Rule, S., Shpilberg, O., Walewski, J. & Ladetto, M. 2014b. Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, **25 Suppl 3**, iii83-92.
- Dunleavy, K., Pittaluga, S., Czuczman, M. S., Dave, S. S., Wright, G., Grant, N., Shovlin, M., Jaffe, E. S., Janik, J. E., Staudt, L. M. & Wilson, W. H. 2009. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, **113**, 6069-76.
- Emmanouilides, C., Rosen, P., Telatar, M., Malone, R., Bosserman, L., Menco, H., Patel, R., Barstis, J. & Grody, W. W. 2000. Excellent tolerance of rituximab when given after mitoxantrone/cyclophosphamide: an effective and safe combination for indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma*, **1**, 146-51; discussion 152-3.
- Fabbri, A., Cencini, E., Rigacci, L., Bartalucci, G., Puccini, B., Dottori, R., Gozzetti, A., Bosi, A. & Bocchia, M. 2013. Efficacy and safety of rituximab plus low-dose oral fludarabine and cyclophosphamide as first-line treatment of Elderly patients with indolent Non hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma*.
- Ferrer, A., Marce, S., Bellosillo, B., Villamor, N., Bosch, F., Lopez-Guillermo, A., Espinet, B., Sole, F., Montserrat, E., Campo, E. & Colomer, D. 2004. Activation of mitochondrial apoptotic pathway in mantle cell lymphoma: high sensitivity to mitoxantrone in cases with functional DNA-damage response genes. *Oncogene*, **23**, 8941-9.
- Foran, J. M., Rohatiner, A. Z., Cunningham, D., Popescu, R. A., Solal-Celigny, P., Ghielmini, M., Coiffier, B., Johnson, P. W., Gisselbrecht, C., Reyes, F., Radford, J. A., Bessell, E. M., Souleau, B., Benzohra, A. & Lister, T. A. 2000. European phase II study of rituximab

- (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol*, **18**, 317-24.
- Forstpointner, R., Dreyling, M., Repp, R., Hermann, S., Hanel, A., Metzner, B., Pott, C., Hartmann, F., Rothmann, F., Rohrberg, R., Bock, H. P., Wandt, H., Unterhalt, M. & Hiddemann, W. 2004. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*, **104**, 3064-71.
- Forstpointner, R., Unterhalt, M., Dreyling, M., Bock, H. P., Repp, R., Wandt, H., Pott, C., Seymour, J. F., Metzner, B., Hanel, A., Lehmann, T., Hartmann, F., Einsele, H., Hiddemann, W. & German Low Grade Lymphoma Study, G. 2006. 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*, **108**, 4003-8.
- Friedberg, J. W., Vose, J. M., Kelly, J. L., Young, F., Bernstein, S. H., Peterson, D., Rich, L., Blumel, S., Proia, N. K., Liesveld, J., Fisher, R. I., Armitage, J. O., Grant, S. & Leonard, J. P. 2011. The combination of bendamustine, bortezomib, and rituximab for patients with relapsed/refractory indolent and mantle cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, **117**, 2807-12.
- Fu, K., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C., Dave, S., Wright, G., Rosenwald, A., Chiorazzi, M., Iqbal, J., Gesk, S., Siebert, R., De Jong, D., Jaffe, E. S., Wilson, W. H., Delabie, J., Ott, G., Dave, B. J., *et al.* 2005. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*, **106**, 4315-21.
- Furtado, M., Johnson, R., Kruger, A., Turner, D. & Rule, S. 2015. Addition of bortezomib to standard dose chop chemotherapy improves response and survival in relapsed mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*, **168**, 55-62.
- Gerecitano, J., Portlock, C., Moskowitz, C., Hamlin, P., Straus, D., Zelenetz, A. D., Zhang, Z., Dumitrescu, O., Sarasohn, D., Lin, D., Pappanicholaou, J., Cortelli, B. M., Neylon, E., Hamelers, R., Wright, J. & O'Connor, O. A. 2009. Phase 2 study of weekly bortezomib in mantle cell and follicular lymphoma. *Br J Haematol*, **146**, 652-5.
- Gerrie, A. S., Zypchen, L. N. & Connors, J. M. 2012. Fludarabine and rituximab for relapsed or refractory hairy cell leukemia. *Blood*, **119**, 1988-91.
- Ghielmini, M., Schmitz, S. F., Burki, K., Pichert, G., Betticher, D. C., Stupp, R., Wernli, M., Lohri, A., Schmitter, D., Bertoni, F. & Cerny, T. 2000. The effect of Rituximab on patients with follicular and mantle-cell lymphoma. Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Ann Oncol*, **11 Suppl 1**, 123-6.
- Ghielmini, M., Schmitz, S. F., Cogliatti, S. B., Pichert, G., Hummerjohann, J., Waltzer, U., Fey, M. F., Betticher, D. C., Martinelli, G., Peccatori, F., Hess, U., Zucca, E., Stupp, R., Kovacsovics, T., Helg, C., Lohri, A., *et al.* 2004. Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly x 4 schedule. *Blood*, **103**, 4416-23.
- Golay, J., Cittera, E., Di Gaetano, N., Manganini, M., Mosca, M., Nebuloni, M., van Rooijen, N., Vago, L. & Introna, M. 2006. The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes. *Haematologica*, **91**, 176-83.
- Golay, J., Zaffaroni, L., Vaccari, T., Lazzari, M., Borleri, G. M., Bernasconi, S., Tedesco, F., Rambaldi, A. & Introna, M. 2000. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated

- cell lysis. *Blood*, **95**, 3900-8.
- Goy, A., Bernstein, S. H., Kahl, B. S., Djulbegovic, B., Robertson, M. J., de Vos, S., Epner, E., Krishnan, A., Leonard, J. P., Lonial, S., Nasta, S., O'Connor, O. A., Shi, H., Boral, A. L. & Fisher, R. I. 2009. Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study. *Ann Oncol*, **20**, 520-5.
- Hainsworth, J. D., Litchy, S., Shaffer, D. W., Lackey, V. L., Grimaldi, M. & Greco, F. A. 2005. Maximizing therapeutic benefit of rituximab: maintenance therapy versus re-treatment at progression in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma--a randomized phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *J Clin Oncol*, **23**, 1088-95.
- Haritunians, T., Mori, A., O'Kelly, J., Luong, Q. T., Giles, F. J. & Koeffler, H. P. 2007. Antiproliferative activity of RAD001 (everolimus) as a single agent and combined with other agents in mantle cell lymphoma. *Leukemia*, **21**, 333-9.
- Heinrich, D. A., Weinkauff, M., Hutter, G., Zimmermann, Y., Jurinovic, V., Hiddemann, W. & Dreyling, M. 2015. Differential regulation patterns of the anti-CD20 antibodies obinutuzumab and rituximab in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*, **168**, 606-10.
- Herold, M., Haas, A., Srock, S., Nesper, S., Al-Ali, K. H., Neubauer, A., Dolken, G., Naumann, R., Knauf, W., Freund, M., Rohrberg, R., Hoffken, K., Franke, A., Ittel, T., Kettner, E., Haak, U., *et al.* 2007. Rituximab added to first-line mitoxantrone, chlorambucil, and prednisolone chemotherapy followed by interferon maintenance prolongs survival in patients with advanced follicular lymphoma: an East German Study Group Hematology and Oncology Study. *J Clin Oncol*, **25**, 1986-92.
- Hess, G., Smith, S. M., Berkenblit, A. & Coiffier, B. 2009. Temsirolimus in mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Semin Oncol*, **36 Suppl 3**, S37-45.
- Hiddemann, W., Kneba, M., Dreyling, M., Schmitz, N., Lengfelder, E., Schmits, R., Reiser, M., Metzner, B., Harder, H., Hegewisch-Becker, S., Fischer, T., Kropff, M., Reis, H. E., Freund, M., Wormann, B., Fuchs, R., *et al.* 2005. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*, **106**, 3725-32.
- Hillmen, P., Cohen, D. R., Cocks, K., Pettitt, A., Sayala, H. A., Rawstron, A. C., Kennedy, D. B., Fegan, C., Milligan, D. W., Radford, J., Mercieca, J., Dearden, C., Ezekwisi, R., Smith, A. F., Brown, J., Booth, G. A., *et al.* 2011. A randomized phase II trial of fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone (FCM) with or without rituximab in previously treated chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, **152**, 570-8.
- Hipp, S., Ringshausen, I., Oelsner, M., Bogner, C., Peschel, C. & Decker, T. 2005. Inhibition of the mammalian target of rapamycin and the induction of cell cycle arrest in mantle cell lymphoma cells. *Haematologica*, **90**, 1433-4.
- Hochster, H., Weller, E., Gascoyne, R. D., Habermann, T. M., Gordon, L. I., Ryan, T., Zhang, L., Colocci, N., Frankel, S. & Horning, S. J. 2009. Maintenance rituximab after cyclophosphamide, vincristine, and prednisone prolongs progression-free survival in advanced indolent lymphoma: results of the randomized phase III ECOG1496 Study. *J Clin Oncol*, **27**, 1607-14.
- Holkova, B., Perkins, E. B., Ramakrishnan, V., Tombes, M. B., Shrader, E., Talreja, N., Wellons, M. D., Hogan, K. T., Roodman, G. D., Coppola, D., Kang, L., Dawson, J., Stuart, R. K., Peer, C., Figg, W. D., Sr., Kolla, S., *et al.* 2011. Phase I trial of bortezomib (PS-341; NSC 681239) and alvocidib (flavopiridol; NSC 649890) in patients with recurrent or refractory B-cell neoplasms. *Clin Cancer Res*, **17**, 3388-97.
- Hoster, E., Dreyling, M., Klapper, W., Gisselbrecht, C., van Hoof, A., Kluin-Nelemans, H. C., Pfreundschuh, M., Reiser, M., Metzner, B., Einsele, H., Peter, N., Jung, W., Wormann, B.,

- Ludwig, W. D., Duhrsen, U., Eimermacher, H., *et al.* 2008. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood*, **111**, 558-65.
- Howard, O. M., Gribben, J. G., Neuberg, D. S., Grossbard, M., Poor, C., Janicek, M. J. & Shipp, M. A. 2002. Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J Clin Oncol*, **20**, 1288-94.
- Jaffe, E. S. 2009. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 523-31.
- Janas, E., Priest, R., Wilde, J. I., White, J. H. & Malhotra, R. 2005. Rituxan (anti-CD20 antibody)-induced translocation of CD20 into lipid rafts is crucial for calcium influx and apoptosis. *Clin Exp Immunol*, **139**, 439-46.
- Jares, P., Colomer, D. & Campo, E. 2007. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer*, **7**, 750-62.
- Jares, P., Colomer, D. & Campo, E. 2012. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest*, **122**, 3416-23.
- Jazirehi, A. R., Gan, X. H., De Vos, S., Emmanouilides, C. & Bonavida, B. 2003. Rituximab (anti-CD20) selectively modifies Bcl-xL and apoptosis protease activating factor-1 (Apaf-1) expression and sensitizes human non-Hodgkin's lymphoma B cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther*, **2**, 1183-93.
- Jazirehi, A. R., Huerta-Yepe, S., Cheng, G. & Bonavida, B. 2005. Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- κ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Cancer Res*, **65**, 264-76.
- Jazirehi, A. R., Vega, M. I. & Bonavida, B. 2007. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res*, **67**, 1270-81.
- Jones, J. A., Rupert, A. S., Poi, M., Phelps, M. A., Andritsos, L., Baiocchi, R., Benson, D. M., Blum, K. A., Christian, B., Flynn, J., Penza, S., Porcu, P., Grever, M. R. & Byrd, J. C. 2013. Flavopiridol can be safely administered using a pharmacologically derived schedule and demonstrates activity in relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol*.
- Jones, J. A., Rupert, A. S., Poi, M., Phelps, M. A., Andritsos, L., Baiocchi, R., Benson, D. M., Blum, K. A., Christian, B., Flynn, J., Penza, S., Porcu, P., Grever, M. R. & Byrd, J. C. 2014. Flavopiridol can be safely administered using a pharmacologically derived schedule and demonstrates activity in relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol*, **89**, 19-24.
- Kitada, S., Zapata, J. M., Andreeff, M. & Reed, J. C. 2000. Protein kinase inhibitors flavopiridol and 7-hydroxy-staurosporine down-regulate antiapoptosis proteins in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **96**, 393-7.
- Klapper, W., Hoster, E., Determann, O., Oschlies, I., van der Laak, J., Berger, F., Bernd, H. W., Cabecadas, J., Campo, E., Cogliatti, S., Hansmann, M. L., Kluin, P. M., Kodet, R., Krivolapov, Y. A., Loddenkemper, C., Stein, H., *et al.* 2009. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop*, **2**, 103-11.
- Kluin-Nelemans, H. C., Hoster, E., Hermine, O., Walewski, J., Trneny, M., Geisler, C. H., Stilgenbauer, S., Thieblemont, C., Vehling-Kaiser, U., Doorduijn, J. K., Coiffier, B., Forstpointner, R., Tilly, H., Kanz, L., Feugier, P., Szymczyk, M., *et al.* 2012. Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*, **367**, 520-31.
- Korz, C., Pscherer, A., Benner, A., Mertens, D., Schaffner, C., Leupolt, E., Dohner, H., Stilgenbauer, S. & Lichter, P. 2002. Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood*, **99**, 4554-61.

- Kouroukis, C. T., Belch, A., Crump, M., Eisenhauer, E., Gascoyne, R. D., Meyer, R., Lohmann, R., Lopez, P., Powers, J., Turner, R. & Connors, J. M. 2003. Flavopiridol in untreated or relapsed mantle-cell lymphoma: results of a phase II study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*, **21**, 1740-5.
- Kovacs, J. R., Li, C., Yang, Q., Li, G., Garcia, I. G., Ju, S., Roodman, D. G., Windle, J. J., Zhang, X. & Lu, B. 2012. Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery. *Cell Death Differ*, **19**, 144-52.
- Kulke, M. H., Bendell, J., Kvols, L., Picus, J., Pommier, R. & Yao, J. 2011. Evolving diagnostic and treatment strategies for pancreatic neuroendocrine tumors. *J Hematol Oncol*, **4**, 29.
- Lamm, W., Kaufmann, H., Raderer, M., Hoffmann, M., Chott, A., Zielinski, C. & Drach, J. 2011. Bortezomib combined with rituximab and dexamethasone is an active regimen for patients with relapsed and chemotherapy-refractory mantle cell lymphoma. *Haematologica*, **96**, 1008-14.
- Le Gouill, S. & Thieblemont, C. 2014. Rituximab Maintenance Versus Wait and Watch after Four Courses of R-DHAP Followed By Autologous Stem Cell transplantation in Previously Untreated Young Patients with Mantle Cell Lymphoma: First Interim Analysis of the Phase III Prospective Lyma Trial, a Lysa Study.) *56th ASH Annual Meeting & Exposition American Society of Hematology*. San Francisco # Abstract 146.
- Lenz, G., Dreyling, M., Hoster, E., Wormann, B., Duhrsen, U., Metzner, B., Eimermacher, H., Neubauer, A., Wandt, H., Steinhauer, H., Martin, S., Heidemann, E., Aldaoud, A., Parwaresch, R., Hasford, J., Unterhalt, M., *et al.* 2005. 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*, **23**, 1984-92.
- Lim, T., Lee, J., Lee, D. J., Lee, H. Y., Han, B., Baek, K. K., Ahn, H. K., Lee, S. J., Park, S. H., Park, J. O., Park, Y. S., Lim, H. Y., Kim, K. M. & Kang, W. K. 2011. Phase I trial of capecitabine plus everolimus (RAD001) in patients with previously treated metastatic gastric cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, **68**, 255-62.
- Lin, T. S., Blum, K. A., Fischer, D. B., Mitchell, S. M., Ruppert, A. S., Porcu, P., Kraut, E. H., Baiocchi, R. A., Moran, M. E., Johnson, A. J., Schaaf, L. J., Grever, M. R. & Byrd, J. C. 2010. Flavopiridol, fludarabine, and rituximab in mantle cell lymphoma and indolent B-cell lymphoproliferative disorders. *J Clin Oncol*, **28**, 418-23.
- Lin, T. S., Ruppert, A. S., Johnson, A. J., Fischer, B., Heerema, N. A., Andritsos, L. A., Blum, K. A., Flynn, J. M., Jones, J. A., Hu, W., Moran, M. E., Mitchell, S. M., Smith, L. L., Wagner, A. J., Raymond, C. A., Schaaf, L. J., *et al.* 2009. Phase II study of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia demonstrating high response rates in genetically high-risk disease. *J Clin Oncol*, **27**, 6012-8.
- Lopes, U. G., Erhardt, P., Yao, R. & Cooper, G. M. 1997. p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J Biol Chem*, **272**, 12893-6.
- Maddocks, K. & Blum, K. A. 2015. Treatment strategies in mantle cell lymphoma. *Cancer Treat Res*, **165**, 251-70.
- Maloney, D. G., Grillo-Lopez, A. J., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., Neidhart, J. A., Janakiraman, N., Foon, K. A., Liles, T. M., Dallaire, B. K., Wey, K., Royston, I., Davis, T. & Levy, R. 1997. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, **90**, 2188-95.
- Marcus, R., Aultman, R. & Jost, F. 2010. A quality-adjusted survival analysis (Q-TWiST) of rituximab plus CVP vs CVP alone in first-line treatment of advanced follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer*, **102**, 19-22.
- Marcus, R., Imrie, K., Belch, A., Cunningham, D., Flores, E., Catalano, J., Solal-Celigny, P., Offner, F., Walewski, J., Raposo, J., Jack, A. & Smith, P. 2005. CVP chemotherapy plus rituximab

- compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood*, **105**, 1417-23.
- Massague, J. 2004. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, **432**, 298-306.
- McKay, P., Leach, M., Jackson, R., Cook, G. & Rule, S. 2012. Guidelines for the investigation and management of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*, **159**, 405-26.
- McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A. J., Link, B. K., Levy, R., Czuczman, M. S., Williams, M. E., Heyman, M. R., Bence-Bruckler, I., White, C. A., Cabanillas, F., Jain, V., Ho, A. D., Lister, J., Wey, K., Shen, D. & Dallaire, B. K. 1998. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*, **16**, 2825-33.
- McLaughlin, P., Hagemester, F. B., Rodriguez, M. A., Sarris, A. H., Pate, O., Younes, A., Lee, M. S., Dang, N. H., Romaguera, J. E., Preti, A. H., McAda, N. & Cabanillas, F. 2000. Safety of fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone combined with rituximab in the treatment of stage IV indolent lymphoma. *Semin Oncol*, **27**, 37-41.
- Morrow, P. K., Wulf, G. M., Ensor, J., Booser, D. J., Moore, J. A., Flores, P. R., Xiong, Y., Zhang, S., Krop, I. E., Winer, E. P., Kindelberger, D. W., Coviello, J., Sahin, A. A., Nunez, R., Hortobagyi, G. N., Yu, D., *et al.* 2011. Phase I/II study of trastuzumab in combination with everolimus (RAD001) in patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer who progressed on trastuzumab-based therapy. *J Clin Oncol*, **29**, 3126-32.
- Morton, L. M., Sampson, J. N., Cerhan, J. R., Turner, J. J., Vajdic, C. M., Wang, S. S., Smedby, K. E., de Sanjose, S., Monnereau, A., Benavente, Y., Bracci, P. M., Chiu, B. C., Skibola, C. F., Zhang, Y., Mbulaiteye, S. M., Spriggs, M., *et al.* 2014. Rationale and Design of the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph) Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monogr*, **2014**, 1-14.
- Nashan, B. & Citterio, F. 2012. Wound healing complications and the use of mammalian target of rapamycin inhibitors in kidney transplantation: a critical review of the literature. *Transplantation*, **94**, 547-61.
- Panwalkar, A., Verstovsek, S. & Giles, F. J. 2004. Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer*, **100**, 657-66.
- Peponi, E., Drakos, E., Reyes, G., Leventaki, V., Rassidakis, G. Z. & Medeiros, L. J. 2006. Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma. *Am J Pathol*, **169**, 2171-80.
- Perez-Galan, P., Dreyling, M. & Wiestner, A. 2011. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*, **117**, 26-38.
- Pham, L. V., Tamayo, A. T., Yoshimura, L. C., Lo, P. & Ford, R. J. 2003. Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Immunol*, **171**, 88-95.
- Phelps, M. A., Lin, T. S., Johnson, A. J., Hurh, E., Rozewski, D. M., Farley, K. L., Wu, D., Blum, K. A., Fischer, B., Mitchell, S. M., Moran, M. E., Brooker-McEldowney, M., Heerema, N. A., Jarjoura, D., Schaaf, L. J., Byrd, J. C., *et al.* 2009. Clinical response and pharmacokinetics from a phase 1 study of an active dosing schedule of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **113**, 2637-45.
- Racila, E., Link, B. K., Weng, W. K., Witzig, T. E., Ansell, S., Maurer, M. J., Huang, J., Dahle, C., Halwani, A., Levy, R. & Weiner, G. J. 2008. A polymorphism in the complement component C1qA correlates with prolonged response following rituximab therapy of follicular lymphoma. *Clin Cancer Res*, **14**, 6697-703.
- Renner, C., Zinzani, P. L., Gressin, R., Klingbiel, D., Dietrich, P. Y., Hitz, F., Bargetzi, M., Mingrone, W., Martinelli, G., Trojan, A., Bouabdallah, K., Lohri, A., Gyan, E., Biaggi, C., Cogliatti, S., Bertoni, F., *et al.* 2012. A multicenter phase II trial (SAKK 36/06) of single-agent everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Haematologica*, **97**, 1085-91.

- Ribrag, V., Gisselbrecht, C., Haioun, C., Salles, G., Golfier, J. B., Ertault, M., Ferme, C., Briere, J., Brice, P. & Mounier, N. 2009. Efficacy and toxicity of 2 schedules of frontline rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus bortezomib in patients with B-cell lymphoma: a randomized phase 2 trial from the French Adult Lymphoma Study Group (GELA). *Cancer*, **115**, 4540-6.
- Richardson, P. G., Briemberg, H., Jagannath, S., Wen, P. Y., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Siegel, D. S., Irwin, D., Schuster, M., Srkalovic, G., Alexanian, R., Rajkumar, S. V., Limentani, S., Alsina, M., Orlowski, R. Z., *et al.* 2006. Frequency, characteristics, and reversibility of peripheral neuropathy during treatment of advanced multiple myeloma with bortezomib. *J Clin Oncol*, **24**, 3113-20.
- Rieken, M. 2010. Molekulare Therapie des Mantelzelllymphoms - In Vitro Wirksamkeit des Proteasom-Inhibitors Bortezomib in Mono- und Kombinationstherapie.) München, Ludwig-Maximilians-Universität zu München.
- Robak, T., Huang, H., Jin, J., Zhu, J., Liu, T., Samoilo, O., Pylypenko, H., Verhoef, G., Siritanaratkul, N., Osmanov, E., Alexeeva, J., Pereira, J., Drach, J., Mayer, J., Hong, X., Okamoto, R., *et al.* 2015. Bortezomib-Based Therapy for Newly Diagnosed Mantle-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, **372**, 944-953.
- Rosich, L., Xargay-Torrent, S., Lopez-Guerra, M., Campo, E., Colomer, D. & Roue, G. 2012. Counteracting autophagy overcomes resistance to everolimus in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res*, **18**, 5278-89.
- Ruan, J., Martin, P., Furman, R. R., Lee, S. M., Cheung, K., Vose, J. M., Lacasce, A., Morrison, J., Elstrom, R., Ely, S., Chadburn, A., Cesarman, E., Coleman, M. & Leonard, J. P. 2011. Bortezomib plus CHOP-rituximab for previously untreated diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*, **29**, 690-7.
- Rudelius, M., Pittaluga, S., Nishizuka, S., Pham, T. H., Fend, F., Jaffe, E. S., Quintanilla-Martinez, L. & Raffeld, M. 2006. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood*, **108**, 1668-76.
- Rule, S., Smith, P., Johnson, P. W., Bolam, S., Follows, G., Gambell, J., Hillmen, P., Jack, A., Johnson, S., Kirkwood, A. A., Kruger, A., Pocock, C., Seymour, J. F., Toncheva, M., Walewski, J. & Linch, D. 2016. The addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide chemotherapy results in a significant improvement in overall survival in patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma: results of a randomized UK National Cancer Research Institute trial. *Haematologica*, **101**, 235-40.
- Rummel, M. J., Niederle, N., Maschmeyer, G., Banat, G. A., von Grunhagen, U., Losem, C., Kofahl-Krause, D., Heil, G., Welslau, M., Balsler, C., Kaiser, U., Weidmann, E., Durk, H., Ballo, H., Stauch, M., Roller, F., *et al.* 2013. Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*, **381**, 1203-10.
- Sabatini, D. M. 2006. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*, **6**, 729-34.
- Salles, G., Mounier, N., de Guibert, S., Morschhauser, F., Doyen, C., Rossi, J. F., Haioun, C., Brice, P., Mahe, B., Bouabdallah, R., Audhuy, B., Ferme, C., Dartigeas, C., Feugier, P., Sebban, C., Xerri, L., *et al.* 2008. Rituximab combined with chemotherapy and interferon in follicular lymphoma patients: results of the GELA-GOELAMS FL2000 study. *Blood*, **112**, 4824-31.
- Sausville, E. A., Johnson, J., Alley, M., Zaharevitz, D. & Senderowicz, A. M. 2000. Inhibition of CDKs as a therapeutic modality. *Ann NY Acad Sci*, **910**, 207-21; discussion 221-2.
- Schreiber, S., Hoellein, A., Decker, T., Jilg, S., Dreyling, M., Peschel, C. & Keller, U. 2015. Everolimus maintenance in patients with mantle cell lymphoma not eligible for intensive therapy: results of a prematurely closed phase 2 study. *Leuk Lymphoma*, 1-3.
- Stephens, D. M., Ruppert, A. S., Maddocks, K., Andritsos, L., Baiocchi, R., Jones, J., Johnson, A. J., Smith, L. L., Zhao, Y., Ling, Y., Li, J., Phelps, M. A., Grever, M. R., Byrd, J. C. & Flynn,

- J. M. 2013. Cyclophosphamide, alvocidib (flavopiridol), and rituximab, a novel feasible chemoimmunotherapy regimen for patients with high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*, **37**, 1195-9.
- Stolz, C., Hess, G., Hahnel, P. S., Grabellus, F., Hoffarth, S., Schmid, K. W. & Schuler, M. 2008. Targeting Bcl-2 family proteins modulates the sensitivity of B-cell lymphoma to rituximab-induced apoptosis. *Blood*, **112**, 3312-21.
- Suzuki, E., Umezawa, K. & Bonavida, B. 2007. Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. *Oncogene*, **26**, 6184-93.
- Takada, Y. & Aggarwal, B. B. 2004. Flavopiridol inhibits NF-kappaB activation induced by various carcinogens and inflammatory agents through inhibition of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclin D1, cyclooxygenase-2, and matrix metalloprotease-9. *J Biol Chem*, **279**, 4750-9.
- Thomson, A. W., Turnquist, H. R. & Raimondi, G. 2009. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol*, **9**, 324-37.
- Treon, S. P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Young, G., Doss, D., Schlossman, R. & Anderson, K. C. 2001. Tumor cell expression of CD59 is associated with resistance to CD20 serotherapy in patients with B-cell malignancies. *J Immunother*, **24**, 263-71.
- Tsang, C. K., Qi, H., Liu, L. F. & Zheng, X. F. 2007. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today*, **12**, 112-24.
- Turner, S. G., Peters, K. B., Vredenburgh, J. J., Desjardins, A., Friedman, H. S. & Reardon, D. A. 2011. Everolimus tablets for patients with subependymal giant cell astrocytoma. *Expert Opin Pharmacother*, **12**, 2265-9.
- van Oers, M. H., Klasa, R., Marcus, R. E., Wolf, M., Kimby, E., Gascoyne, R. D., Jack, A., Van't Veer, M., Vranovsky, A., Holte, H., van Glabbeke, M., Teodorovic, I., Rozewicz, C. & Hagenbeek, A. 2006. Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial. *Blood*, **108**, 3295-301.
- Vega, M. I., Huerta-Yepaz, S., Garban, H., Jazirehi, A., Emmanouilides, C. & Bonavida, B. 2004. Rituximab inhibits p38 MAPK activity in 2F7 B NHL and decreases IL-10 transcription: pivotal role of p38 MAPK in drug resistance. *Oncogene*, **23**, 3530-40.
- Venkataraman, G., Maududi, T., Ozpuyan, F., Bahar, H. I., Izban, K. F., Qin, J. Z. & Alkan, S. 2006. Induction of apoptosis and down regulation of cell cycle proteins in mantle cell lymphoma by flavopiridol treatment. *Leuk Res*, **30**, 1377-84.
- Vose, J. M. 2012. Autotransplantation for mantle cell lymphoma. *Cancer J*, **18**, 427-31.
- Wang, M., Han, X. H., Zhang, L., Yang, J., Qian, J. F., Shi, Y. K., Kwak, L. W., Romaguera, J. & Yi, Q. 2008. Bortezomib is synergistic with rituximab and cyclophosphamide in inducing apoptosis of mantle cell lymphoma cells in vitro and in vivo. *Leukemia*, **22**, 179-85.
- Weigert, O., Weidmann, E., Mueck, R., Bentz, M., von Schilling, C., Rohrberg, R., Jentsch-Ullrich, K., Hiddemann, W. & Dreyling, M. 2009. A novel regimen combining high dose cytarabine and bortezomib has activity in multiply relapsed and refractory mantle cell lymphoma - long-term results of a multicenter observation study. *Leuk Lymphoma*, **50**, 716-22.
- Weiglein, T. 2012. Molekular gezielte Therapie des Mantelzelllymphoms - In Vitro Wirksamkeit von Flavopiridol in Mono- und Kombinationstherapie.) München, Ludwig-Maximilians-Universität zu München.
- Weng, W. K. & Levy, R. 2001. Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, **98**, 1352-7.
- White, E. & DiPaola, R. S. 2009. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res*, **15**, 5308-16.

- Williams, M. E. & Densmore, J. J. 2005. Biology and therapy of mantle cell lymphoma. *Curr Opin Oncol*, **17**, 425-31.
- Witzig, T. E., Reeder, C. B., LaPlant, B. R., Gupta, M., Johnston, P. B., Micallef, I. N., Porrata, L. F., Ansell, S. M., Colgan, J. P., Jacobsen, E. D., Ghobrial, I. M. & Habermann, T. M. 2011. A phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed aggressive lymphoma. *Leukemia*, **25**, 341-7.
- Xu, Z. Z., Wang, W. F., Fu, W. B., Wang, A. H., Liu, Z. Y., Chen, L. Y., Guo, P. & Li, J. M. 2014. Combination of rituximab and mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, **55**, 1151-7.
- Yatabe, Y., Suzuki, R., Tobinai, K., Matsuno, Y., Ichinohasama, R., Okamoto, M., Yamaguchi, M., Tamaru, J., Uike, N., Hashimoto, Y., Morishima, Y., Suchi, T., Seto, M. & Nakamura, S. 2000. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*, **95**, 2253-61.
- Yee, K. W., Zeng, Z., Konopleva, M., Verstovsek, S., Ravandi, F., Ferrajoli, A., Thomas, D., Wierda, W., Apostolidou, E., Albitar, M., O'Brien, S., Andreeff, M. & Giles, F. J. 2006. Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*, **12**, 5165-73.
- Zaja, F., Federico, M., Vitolo, U. & Zinzani, P. L. 2014. Management of relapsed/refractory mantle cell lymphoma: a review of current therapeutic strategies. *Leuk Lymphoma*, **55**, 988-98.
- Zhou, B. B. & Elledge, S. J. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, **408**, 433-9.
- Zhu, A. X., Abrams, T. A., Miksad, R., Blaszkowsky, L. S., Meyerhardt, J. A., Zheng, H., Muzikansky, A., Clark, J. W., Kwak, E. L., Schrag, D., Jors, K. R., Fuchs, C. S., Iafrate, A. J., Borger, D. R. & Ryan, D. P. 2011. Phase 1/2 study of everolimus in advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **117**, 5094-102.
- Zinzani, P. L., Pellegrini, C., Broccoli, A., Casadei, B., Argnani, L. & Pileri, S. 2013. Fludarabine-mitoxantrone-rituximab regimen in untreated intermediate/high-risk follicular non-Hodgkin's lymphoma: experience on 142 patients. *Am J Hematol*, **88**, E273-6.

9 DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Martin Dreyling für das interessante Thema und seine uneingeschränkte und immer freundliche Unterstützung bedanken.

Danke an meinen Betreuer Herr Dr. Weinkauff für die Geduld und intensive Betreuung, sowie an Dr. Grit Hutter, Dr.med. Alina Postnikova, Dr. med. Tobias Weiglein, Dr. med. Daniel Heinrich, Stefan Bayerl, Yvonne Zimmermann und alle Kollegen im Labor für die nette Zusammenarbeit. Ganz lieben Dank an meine Familie Maria und (†)Tone Dechevi für die grenzlose Liebe und Hilfe, sowie an meine Freunde Sotir Chervenkov und Monika Tatarska für die große Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand