

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

**Gezielte molekulare Therapie
des
Mantelzell-Lymphoms
–
In Vitro Wirksamkeit
von
Palbociclib, Ibrutinib und Idelalisib
in
Mono- und Kombinationstherapie**

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

vorgelegt von
Roland Dietzfelbinger

aus
Nürnberg

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Dreyling

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralf Schmidmaier

Prof. Dr. Christoph Salat

Prof. Dr. Petro E. Petrides

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Anna Zoellner

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung.....	4
1.1 Das Mantelzell-Lymphom.....	4
1.1.1 Definition.....	4
1.1.2 Morphologie.....	4
1.1.3 Immuntypisierung.....	6
1.1.4 Zytogenetik und Molekulargenetik.....	6
1.1.5 Epidemiologie, Klinik und Verlauf.....	11
1.1.6 Therapie.....	13
2. Molekulare Therapeutika.....	17
2.1 Der CDK4/6-Inhibitor Palbociclib.....	17
2.2 Der B-Zell-Rezeptor und der BTK-Inhibitor Ibrutinib.....	19
2.2.1 Der B-Zell-Rezeptor.....	19
2.2.2 Der BTK-Inhibitor Ibrutinib.....	20
2.3 Der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg und der PI3K-Inhibitor Idelalisib.....	21
2.3.1 Der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg.....	21
2.3.2 Der PI3K-Inhibitor Idelalisib.....	24
3. Zielsetzung dieser Arbeit.....	25
4. Material und Methoden.....	26
4.1 Material.....	26
4.1.1 Zelllinien.....	26
4.1.2 Inhibitoren.....	26
4.1.3 Lösungen und Puffer.....	26
4.1.4 Verwendete Geräte.....	27
4.1.5 Softwareprogramme.....	27

Inhaltsverzeichnis

4.2	Zellkultur.....	28
4.2.1	Zellliniencharakterisierung.....	28
4.2.2	Zellkulturbedingungen.....	29
4.2.3	Einfrieren und Auftauen.....	29
4.2.4	Zellquantifizierung mittels automatisierter Vi-Cell-Analyse.....	30
4.3	Zellzyklusanalyse mittels Propidium-Iodid-Färbung.....	30
4.4	Apoptosedetektion mit Annexin V-PE und 7-AAD Färbung.....	31
4.5	Gewinnung von B-Zellen aus humanem Blut mittels Ficoll.....	32
4.6	Berechnung der Fraction of Product.....	32
5.	Ergebnisse.....	34
5.1	Der CDK4/6-Inhibitor Palbociclib.....	34
5.1.1	Dosisabhängige Proliferationshemmung in MCL-Zelllinien.....	34
5.1.2	Zeitabhängige Proliferationshemmung in MCL-Zelllinien.....	37
5.1.3	Auswirkungen von Palbociclib auf den Zellzyklus.....	39
5.1.4	Apoptoseinduktion durch Palbociclib.....	41
5.1.5	Wirkung von Palbociclib auf gesunde humane B-Zellen.....	43
5.2	Der BTK-Inhibitor Ibrutinib.....	48
5.2.1	Zeitabhängige Proliferationshemmung in MCL-Zelllinien.....	48
5.2.2	Auswirkungen von Ibrutinib auf den Zellzyklus.....	51
5.2.3	Apoptoseinduktion durch Ibrutinib.....	52
5.3	Der PI3K-Inhibitor Idelalisib.....	53
5.3.1	Zeitabhängige Proliferationshemmung in MCL-Zelllinien.....	53
5.3.2	Auswirkungen von Idelalisib auf den Zellzyklus.....	56
5.3.3	Apoptoseinduktion durch Idelalisib.....	57
5.4	Kombination von Palbociclib und Ibrutinib.....	58
5.4.1	Zeitabhängige Proliferationshemmung.....	58
5.4.2	Auswirkungen der Kombinationstherapie auf den Zellzyklus....	62
5.4.3	Apoptoseinduktion durch die Kombinationstherapie.....	64

Inhaltsverzeichnis

5.5	Kombination von Palbociclib und Idelalisib.....	65
5.5.1	Zeitabhängige Proliferationshemmung.....	65
5.5.2	Auswirkungen der Kombinationstherapie auf den Zellzyklus....	69
5.5.3	Apoptoseinduktion durch die Kombinationstherapie.....	71
5.5.4	Zeitversetzte Gabe von Palbociclib und Idelalisib.....	72
6.	Diskussion.....	76
6.1	Wirksamkeit von Palbociclib auf humane Mantelzell- Lymphom-Zelllinien.....	76
6.1.1	Einfluss von p53.....	77
6.1.2	Relevanz des CDK4-Inhibitors p16 ^{INK4a}	78
6.1.3	CDK-Status und Zellzyklus.....	79
6.1.4	Tumorspezifische Wirkung.....	81
6.2	Wirksamkeit von Palbociclib in Kombinationstherapie auf humane Mantelzell-Lymphom-Zelllinien.....	82
6.2.1	Palbociclib in Kombination mit Ibrutinib.....	83
6.2.2	Palbociclib in Kombination mit Idelalisib.....	85
6.2.3	Wirksamkeit der zeitversetzten Gabe von Palbociclib und Idelalisib.....	88
6.2.4	Apoptoseinduktion der Mono- und Kombinationstherapie.....	90
6.2.5	Analyse des Fraction of Product.....	91
6.2.6	Einfluss des Mikroumfeldes auf das MCL.....	92
7.	Zusammenfassung.....	94
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	95
9.	Literaturverzeichnis.....	97
10.	Danksagungen.....	110

1. Einführung

1.1 Das Mantelzell-Lymphom

1.1.1 Definition

Das Mantelzell-Lymphom wurde erstmals in den frühen 1970er Jahren von Lennert et al. als zentrozytisches Lymphom beschrieben. Ausgehend von naiven B-Zellen, die das Keimzentrum noch nicht durchlaufen haben, wurde es im Laufe der Zeit als eigenständige Entität anerkannt (Lennert et al., 1975). 1974 hat der *European Lymphoma Club* im Rahmen der KIEL-Klassifikation den Begriff zentrozytisches Lymphom etabliert. Erst 1992 wurde von der *International Lymphoma Study Group* der Terminus „Mantelzell-Lymphom“ eingeführt und durch die WHO-Klassifikation, die sich auf die REAL-Klassifikation stützt, weltweit einheitlich als Mantelzell-Lymphom (MCL) klassifiziert (Swerdlow et al., 2002; Drexler et al., 2002). Grundsätzlich ist das MCL eher selten und macht etwa 5-10% aller Non-Hodgkin-Lymphome aus, wobei es mit einer sehr schlechten Prognose bei einer medianen Überlebenszeit von etwa 3 Jahren - mit wenig Langzeitüberlebenden - einhergeht (Bertoni et al., 2007). Allerdings wurde beschrieben, dass das mittlere Überleben in den letzten Jahren auf bis zu 5 Jahre angestiegen ist (Herrman et al., 2009), wenngleich die Diagnose meist erst in einem fortgeschrittenen Ann-Arbor-Stadium diagnostiziert wird (Ghielmini et al., 2009). Charakteristisch für das Mantelzell-Lymphom ist die Chromosomentranslokation t(11;14)(q13;q32), die zu einer Überexpression von Cyclin D1 führt und dadurch eine ungehemmte Zellproliferation ermöglicht (Zucca et al., 1994).

1.1.2 Morphologie

Histologisch lassen sich drei verschiedene Architekturstrukturen des MCL differenzieren, die unterschiedliche Stadien der Erkrankung darstellen. Weiterhin leitet sich durch diese Architekturformen der Name „Mantelzell-Lymphom“ ab, da es von

naiven B-Zellen der Mantelzone des Lymphknotens ausgeht. Im Frühstadium finden sich unter dem Mikroskop neoplastische Infiltrationen, die das reaktive Keimzentrum umgeben und sich auf die Mantelzone des Lymphoms beschränken. Im fortgeschrittenen Verlauf zeigt sich entweder eine unklare noduläre Struktur ohne reaktives Keimzentrum oder ein diffuses infiltratives Wachstum unter Auslöschung der Lymphknotenarchitektur (Swerdlow et al., 2008; Tiemann et al., 2005). Majlis et al. konnten zeigen, dass in Abhängigkeit des histologischen Wachstumsmusters auch das mittlere Überleben signifikant variieren kann. Die diffuse Wachstumsform geht dabei mit einem etwas schlechteren mittleren Überleben einher als die noduläre Variante (Majlis et al., 1997). Das Mantelzell-Lymphom zeigt vier verschiedene zytologische Varianten, die sich auch durch ihren klinischen Verlauf unterscheiden. Zum einen findet sich der klassische Subtyp, der durch eine monomorphe Proliferation von kleinen bis mittelgroßen Zellen mit wenig Zytoplasma und kondensiertem Chromatin auffällt. Dabei imponieren die Zellkerne irregulär konfiguriert bei gleichzeitig diskret vorliegenden Nucleoli. Es gibt weiterhin einen kleinzelligen Subtyp mit kleinen runden Lymphozyten und dicht gedrungenem Chromatin, ähnlich den Lymphozyten der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL). Der klinisch wesentlich aggressivere und somit mit einem schlechteren Outcome einhergehende blastoide Subtyp, wird seinerseits noch einmal in eine blastische und eine pleomorphe Variante eingeteilt. Die pleomorphe Untergruppe des blastoiden Subtyps hat mittelgroße bis große Zellen mit gespaltenem oder auch ovalem Zellkern. Gleichzeitig ist das Chromatin hier blass oder kondensiert neben einer moderaten Menge an farbarmem Zytoplasma. Bei der blastischen Form finden sich mittelgroße Blasten, die mit ihrem fein verteilten Chromatin bei schmalen Zytoplasmasaum morphologisch sowohl Zentrozyten als auch Zentroblasten ähneln. Wichtig ist hier die hohe Anzahl an Mitosen, die auch mit vielen apoptotischen Körpern einhergehen (Bertoni et al., 2007; Ghielmini et al., 2009; Swerdlow et al., 2008).

Differentialdiagnostisch kann das Mantelzell-Lymphom mit seiner zytologischen und histopathologischen Architektur vielen anderen Lymphom-Subtypen ähneln. Neben dem Follikulären Lymphom, müssen auch das Marginalzonen-Lymphom, die chronisch lymphatische Leukämie oder auch - gerade bei der blastoiden Variante - die großzelligen Lymphome differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden (Weisenburger et al., 1996; Campo et al., 1999).

1.1.3 Immuntypisierung

Charakteristisch für das Mantelzell-Lymphom ist ein Phänotyp, wie ihn auch reife B-Zellen besitzen. Exprimiert werden CD19, CD20, CD22, CD24, CD43, CD45, CD79a und HLA-DR. Weiterhin positiv zeigen sich die MCL-Zellen für FMC7, bcl-2 und CD5, dem T-Zell-assoziierten Antigen (Bertoni et al., 2004). Andererseits kann meist eine Negativität für CD10, CD23 und auch den Keimzentrumsmarker bcl-6 festgestellt werden, wobei es auch Fälle gibt, in denen CD10, bcl-6 oder auch weitere T-Zell-Marker wie CD8 oder CD7 positiv sind (Hoffman et al., 1998; Camacho et al., 2004). Früher wurde CD23 als wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen dem MCL und der CLL herangezogen, jedoch hat sich eine variable Expression von CD23 sowohl in der CLL als auch im MCL gezeigt, so dass dieses Kriterium nicht mehr zielführend ist. Es konnte gezeigt werden, dass in fast der Hälfte der MCL-Fälle CD23 exprimiert wird, wobei sich im klinischen Verlauf eine Änderung zeigen kann (Bertoni et al., 2004). Oberflächenantigene vom Typ der Immunglobuline werden moderat bis stark exprimiert, entweder als IgM oder als IgD oder beide Subtypen zusammen. Normale B-Zellen tragen verstärkt Igκ-Leichtketten, im Gegensatz zu den MCL-Zellen, die eine Dominanz für Igλ-Leichtketten zeigen (Bertoni et al., 2007).

1.1.4 Zytogenetik und Molekulargenetik

Das Hauptcharakteristikum des Mantelzell-Lymphoms ist die chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32). Mittel der Wahl zur Detektion dieser Translokation ist die *Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung* (FISH), womit sie in fast allen Fällen des MCL festgestellt werden kann (Vaandrager et al., 1996). Diese führt dazu, dass das Gen für Cyclin D1 (*CCND1*), welches auf Chromosom 11 liegt, direkt unter die Kontrolle des IgH-Promotors von Chromosom 14 gestellt wird. Im Vergleich zu normalen B-Lymphozyten kommt es dadurch zu einer verstärkten Expression von Cyclin D1, wodurch die Steuerung des Zellzyklus speziell der Übergang von der G1-Phase zur S-Phase empfindlich gestört wird und somit eine gesteigerte Zellproliferation folgt (Jares et al., 2012). Diese Translokation findet im prä-B-Zell-Stadium statt, während die

V(D)J-Segmente der IgH-variablen Region (*IGHV*) rekombinant zusammengesetzt werden. Da MCL-Zellen allerdings den typischen Phänotyp reifer B-Zellen zeigen, muss angenommen werden, dass sie erst in späteren Stadien der Differenzierung ihre neoplastische Aktivität in vollem Umfang erhalten (Welzel et al., 2001). Das MCL kann im Bereich der variablen Region des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gens (*IGHV*), entweder Keimzentrumskonfiguration haben und somit unmutiert und als naiv angesehen werden; oder es beinhaltet somatische Mutationen, initiiert durch einen Antigenkontakt. Es werden verschiedene *IGHV*-Gene benutzt, wie *IGHV3-21*, *IGHV3-23* oder auch *IGHV4-34*, wobei in bis zu 40% der Fälle auch somatische Mutationen des *IGHV*-Gens zu finden sind. Zwischen 15% und 40% der MCL-Fälle zeigen eine somatische Hypermutation der variablen Region des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gens, so dass die Zellen im Bereich des Keimzentrums Mutationen durchgemacht haben (Perez-Galan et al., 2012; Jares et al., 2012). Der *IGHV*-Status korreliert nicht mit dem mittleren Überleben (Kienle et al., 2003), allerdings finden sich häufig Mutationen des *IGHV*-Gens in MCL-Fällen, die sich klinisch mit einer leukämischen Komponente zeigen und kein nodales Wachstum aufweisen. Dies geht gleichzeitig mit einer längeren Überlebenszeit einher (Orchard et al., 2003).

Das *CCND1*-Gen kodiert für das Protein Cyclin D1, welches durch alternatives Splicing in zwei verschiedenen Isoformen vorliegen kann. Eine Variante ist Cyclin D1a, das entweder als ein 4,5 kb langes Transkript entsteht, welches sich durch eine lange 3'-untranslatierte Region von der kürzeren 1,5 kb langen Transkriptionsvariante unterscheidet, wobei beide Transkripte den gesamten kodierenden Bereich enthalten. Pathogenetisch relevant für die vermehrte Bildung des kurzen Transkripts sind Punktmutationen und genomische Deletionen in der 3'-untranslatierten Region oder Änderungen des *CCND1*-Locus (Deshpande et al., 2009). Dadurch kommt es zur vermehrten Bildung der kurzen Variante, die mangels AU-Element eine höhere Stabilität zeigt. Das lange Transkript weist auf seiner 3'-untranslatierten Region ein AU-reiches Element auf, durch welches es relativ instabil wird und nur noch eine Halbwertszeit von etwa 30 min aufweist. Im MCL kann es gerade in aggressiven Varianten zu einer Dominanz der kurzen stabilen Variante kommen, so dass die Zellproliferation begünstigt wird, was letztlich mit einer erhöhten Wachstumsrate der Zelle und auch einer schlechteren Prognose einhergeht (Perez-Galan et al., 2011; Jarez

et al., 2008). Die andere Isoform von Cyclin D1, Cyclin D1b, hingegen kann nicht in jedem MCL nachgewiesen werden und spielt nur eine untergeordnete Rolle, allerdings ist mit dieser Proteinvariante eine erhöhte Onkogenität verbunden (Marzec et al., 2006). Fu et al. fanden allerdings auch Cyclin D1⁻-Fälle, in welchen die Translokation t(11;14) (q13;q32) nicht nachgewiesen werden konnte. Gleichwohl findet sich dafür eine Überexpression von Cyclin D2 oder auch Cyclin D3 anstelle von Cyclin D1 (Fu et al., 2005). Als Pathomechanismus konnte eine Translokation t(2;12)(p12;p13) entdeckt werden, wodurch das *CCND2*-Gen unter die Kontrolle des Igg-Leichtketten-Genlocus gestellt wird (Geske et al., 2006). Für die Diagnostik hat sich hier SOX11 als hilfreich erwiesen, da dieser Marker sowohl bei Cyclin D1⁺-Fällen, als auch bei Cyclin D1⁻-Fällen exprimiert wird (Mozos et al., 2009).

Cyclin D1 spielt in Kombination mit den cyclin-abhängigen-Kinasen (CDK) in der Zellzyklusproliferation eine entscheidende Rolle. Der aus Cyclin D1 und CDK4 bzw. CDK6 gebildete Komplex phosphoryliert RB, wodurch es seine hemmende Wirkung auf die Zellzyklusproliferation verliert, indem es den Transkriptionsfaktor E2F freigibt. Dadurch können mehrere Proteine transkribiert werden, die für die Zellproliferation relevant sind. So kann die Zelle von der G1-Phase in die S-Phase übergehen, in welcher schließlich die DNS repliziert wird (Hunter et al., 1994) (siehe Abbildung 1). Erhöhte Konzentrationen des Cyclin D/CDK4/6-Komplexes führen zu einem beschleunigten und verkürzten Übergang von der G1-Phase in die S-Phase und steigern somit die Zellproliferation.

Weiterhin werden durch erhöhte Mengen dieser Komplexe die Inhibitoren p27^{kip1} und p21^{WAF/kip1} gehemmt, welche physiologisch Cyclin E/CDK2 hemmen. Cyclin E/CDK2 phosphoryliert auch RB, so dass es zur Hyperphosphorylierung kommt und somit der Eintritt in die S-Phase unwiderruflich eingeleitet wird (Sherr et al., 2002). Die Überexpression von Cyclin D1 führt somit durch den Verlust der inhibitorischen Wirkung von RB, p27^{kip1} und p21^{WAF/kip1} zu einer gesteigerten Zellproliferation. Rosenwald et al. konnten zeigen, dass die Cyclin D1-Überexpressionsrate direkt mit der Aktivität der Zellproliferation des MCL korreliert (Rosenwald et al., 2003).

In der blastoiden aggressiven Variante des MCL konnte eine homozygote Deletion des Genlocus *CDKN2A* in 30% der MCL-Fälle gefunden werden, welche auf dem kurzen Arm der Region 21 des Chromosoms 9 liegt. Dies betrifft zwei wichtige regulatorische

Pfade des Zellzyklus und geht mit einer erhöhten Proliferation einher (Jares et al., 2008). Durch die Deletion geht der wichtige Inhibitor p16^{INK4a} verloren, der am Anfang des INK4a/CDK4/RB1-Weges steht. p16^{INK4a} inhibiert physiologisch CDK4 und nimmt damit direkt Einfluss auf den Zellzyklus, indem CDK4 daran gehindert wird, zusammen mit Cyclin D1 RB zu phosphorylieren. Nur über eine Phosphorylierung von RB werden die für die Progression von der G1-Phase in die S-Phase relevanten Transkriptionsfaktoren freigegeben. Durch den Verlust von p16^{INK4a} wird CDK4 entsprechend nicht mehr inhibiert, was zu einer erhöhten Aktivität von CyclinD1/CDK4 führt und damit zu einer dysregulierten Zellzyklusproliferation. Derselbe Genlocus *CDKN2A* kodiert zusätzlich auch für p14^{ARF}, ein weiteres wichtiges regulatorisches Protein für den Zellzyklus, welches am Beginn der ARF/MDM2/p53-Kaskade steht. p53 reguliert als wichtiger Tumorsuppressor die Funktion des Zellzyklus, zum einen durch Arretierung der Zellzyklusproliferation. Bei fehlerhafter DNS-Replikation führt p53 zum anderen entweder zu einer DNS-Reparatur oder final zur Einleitung der Apoptose. Über eine Hemmung des MDM2-kontrollierten Abbaus des p53 im Proteasom nimmt der Inhibitor p14^{ARF} direkten Einfluss auf die Konzentration des aktiven p53. Durch einen Verlust dieser Inhibition wird p53 mehr und mehr abgebaut, womit auch seine regulatorische Wirkung auf den Zellzyklus verloren geht (Fernandez et al., 2005).

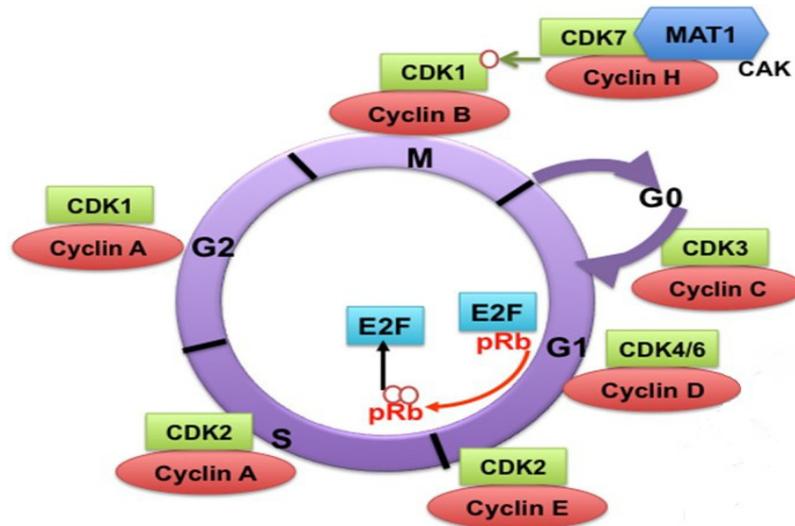


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus

Dargestellt sind die verschiedenen Phasen des Zellzyklus und die maßgeblich beteiligten Enzyme der Regulation. Cyclin D in Komplexbildung mit CDK4/6 vermittelt den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase. Dies wird über eine Freigabe des Transkriptionsfaktors E2F durch Phosphorylierung von RB bewerkstelligt.

Modifiziert nach Aleem et al., 2015

Neben der gestörten Zellzyklusregulation als wichtiger Pathomechanismus in der Genese des MCL ist eine fehlerhafte Antwort der Reparaturmechanismen bei DNS-Schäden ebenfalls relevant.

In etwa 20-50% der MCL-Fälle findet sich eine Deletion auf dem Chromosom 11q22-23, wobei das *ATM*-Gen betroffen ist. Normalerweise wird bei einer DNS-Schädigung das *ATM*-Gen aktiviert, wodurch eine Serin/Threonin-Kinase aus der Familie der PI3-Kinasen exprimiert wird, die eine wichtige Rolle in der Antwort auf DNS-Doppelstrangbrüche spielt. Es phosphoryliert p53, MDM2, BCRA1, CHK1, CHK2 und NBS1, die einen G1- bzw. G2- Arrest einleiten können (Monni et al., 1999; Camacho et al., 2002). Durch den Funktionsverlust des Gens erhöht sich das Risiko weiterer chromosomaler Translokationen während des V(D)J-Rearrangements, so dass hier von einem frühen Zeitpunkt der Tumorentstehung ausgegangen werden kann. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Verlust von 11q nicht mit einer schlechteren klinischen Prognose einhergeht und auch das Zellwachstum nicht beeinflusst wird (Bertoni et al.,

2004). Die einzelnen Faktoren in der Signaltransduktionskaskade des *ATM*-Gens können auch direkt betroffen sein. So kann auch p53 direkt alteriert sein. Als eines der wichtigsten Tumorsuppressorproteine übernimmt es bei einer DNS-Schädigung entweder eine Vermittlung des Zellzyklusarrestes, induziert die Apoptose oder initiiert direkt eine Reparatur der DNS. In etwa 30% der Fälle der blastoiden Variante – bei der klassischen Form findet sich kaum ein funktionsloses p53 - findet sich ein Verlust des p53-Proteins, was somit mit einer erhöhten Proliferationsrate und konsekutiv mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Camacho et al., 2002; Jares et al., 2008).

Rizatti et al. haben mehrere Gene entdeckt, die im MCL aberrant exprimiert werden und somit zur Pathogenese des MCL beitragen. Wichtige Regulationsmechanismen, wie der WNT-Signalweg oder auch der TNF β -Signalweg, werden empfindlich gestört, wodurch es zur Apoptose kommen kann, aber auch zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, zur Immunsupprimierung oder schließlich auch zur Angiogenese. Im MCL ist BCL2, ein Inhibitor der Apoptose, hochreguliert und gleichzeitig BID, ein proapoptotisches Protein, herunterreguliert. Dies führt dazu, dass die Regulation der Apoptose im MCL zur antiapoptotischen Seite verschoben ist und den malignen Zellen einen Überlebensvorteil verschafft (Rizatti et al., 2005).

Neben diesen zwei Hauptmechanismen in der Entstehung des MCL, zum einen die Zellzyklusdysregulation, bedingt durch eine Überexpression von Cyclin D1, zum anderen der Kontrollverlust bei Vorgängen in der DNS-Reparatur wurden auch andere pathogenetische Faktoren beschrieben, die ihren Teil zur Pathogenese des MCL beitragen. Neben dem NF κ B-Weg, kann auch eine Überexpression von Signalmolekülen des Hedghog-Signalweges und des WNT-Signalweges im MCL zur Tumorentstehung beitragen. Auch Veränderungen im B-Zell-Rezeptor (BCR) und in der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade tragen zur Pathogenese des MCL bei (Perez-Galan et al., 2011).

1.1.5 Epidemiologie, Klinik und Verlauf

Das Mantelzell-Lymphom macht etwa 5-10% aller Non-Hodgkin-Lymphome aus und stellt somit eine eher seltene Entität dar (Lenz et al., 2004). Mit einer Dominanz für das

männliche Geschlecht erkranken männliche Patienten im Verhältnis 3:1 häufiger als Frauen, bei einem mittleren Erkrankungsalter zwischen dem 60-65 Lebensjahr. Die mittlere Überlebenszeit beträgt dabei lediglich 3-5 Jahre (Inwards et al., 2001; Bertoni et al., 2007). Eingeteilt nach der Ann-Arbor-Klassifikation werden die meisten MCL-Fälle in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (Stadium III-IV), seltener lässt sich bei Diagnosestellung eine B-Symptomatik feststellen (Lenz et al., 2004). Häufig zeigt sich eine generalisierte Lymphadenopathie, massive Splenomegalie oder auch eine Infiltration des Knochenmarks, wobei etwa 20-30% der Fälle mit einer leukämischen Komponente verlaufen (Tiemann et al., 2005; Perez-Galan et al., 2011). Andere extranodale Manifestationen können die Leber, den Gastrointestinaltrakt oder auch den Waldeyer'schen Rachenring betreffen. Sehr selten ist auch das zentrale Nervensystem befallen, wobei dies dann ein sehr fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung darstellt und eher mit der aggressiveren blastoiden Variante des MCL einhergeht (Gill et al., 2008; Ferrer et al., 2008).

An wichtigen Laborparametern finden sich bei der Hälfte der Patienten erhöhte LDH-Spiegel, eine Anämie oder ein erhöhtes β 2-Mikroglobulin. Monoklonale Immunglobuline zeigen sich hingegen selten (Bosch et al., 1998). Prognostisch relevant ist die Menge der leukämischen Zellen, der Allgemeinzustand des Patienten, eine eventuell vorhandene Splenomegalie, ein hohes Patientenalter und auch ein fortgeschrittenes Ann-Arbor-Stadium IIIB-IVB. Diese Faktoren gehen mit einer signifikant schlechteren Prognose einher (Bosch et al., 1998; Fernandez et al., 2005).

Um noch genauer einschätzen zu können, wie das klinische Outcome ist, kommt der „*Mantle Cell International Prognostic Index*“ (MIPI) zum Einsatz. MIPI ist ein Punktesystem, in welches Faktoren wie Alter, LDH, Leukozytenzahl und der Performance Status einfließen. Durch den gebildeten Punktwert lässt sich die 5-Jahres-Überlebensrate einschätzen (Hoster et al., 2008). Die Patienten werden entsprechend ihres erreichten MIPI-Punktwertes in drei Kategorien eingeteilt. Bei Patienten der Gruppe „*Low-Risk*“ betrug die 5-Jahres-Überlebensrate 100%, wobei in der Gruppe „*Intermediate-Risk*“ ein Zeitraum von 51 Monaten und in der „*High-Risk*“-Gruppe ein Zeitraum von 29 Monaten ermittelt wurde (Brett et al., 2013).

Ein weiterer wichtiger prognostischer Faktor ist der Ki-67-Index, definiert als der Anteil von Ki-67-positiven Zellen unter den Lymphomzellen, die sich in der Proliferation

befinden. Es konnte gezeigt werden, dass ein hoher prozentualer Anteil von Ki-67-positiven Zellen und somit eine hohe Teilungsrate mit einem schlechteren Outcome einhergeht (Tiemann et al., 2005). Allerdings wird der Ki-67-Index bisher nicht herangezogen, um klinisch-therapeutische Entscheidungen zu treffen (Klapper et al., 2009).

1.1.6 Therapie

Die Therapie des Mantelzell-Lymphoms wird durch mehrere Umstände erschwert. Zum einen wird die Erkrankung häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert (Ann-Arbor-Stadium III-IV), zum anderen spricht die Krankheit häufig nur kurzzeitig oder nur unzureichend auf therapeutische Interventionen an. So kann es nach initialem Ansprechen nach 2-3 Jahren zu einem Wiederauftreten der Erkrankung kommen. Die Prognose des MCL ist im Vergleich zu anderen Non-Hodgkin-Lymphomen eher schlechter, abhängig vom Stadium der Erkrankung (Wang et al., 2014). Bisweilen hat sich keine Standardtherapie zur Behandlung des MCL etabliert, wenngleich in den letzten Jahren die Behandlung große Verbesserungen erfahren hat und neue Studien nach und nach die Prognose stetig verbessern (Noel et al., 2012).

Wenn die Erkrankung in frühen Stadien (Ann-Arbor-Stadium I-II) diagnostiziert wird, ist die systemische Immunochemotherapie und konsolidierende Radiotherapie Mittel der Wahl. Eine retrospektive Studie konnte zeigen, dass in den Stadien I und II die Radiotherapie als Zusatz zur normalen Induktionstherapie ein signifikant besseres PFS nach 5 Jahren hatte (73% gegenüber 13% ohne Radiotherapie). Zusätzlich ist die Behandlung im Stadium I vielversprechender als in Stadium II (73% PFS gegenüber 20% PFS) (Leitch et al., 2003). Dieses Ergebnis eines längeren PFS im Stadium I gegenüber Stadium II mit einer Radiochemotherapie konnte in einer weiteren Studie bestätigt werden (Bernard et al., 2013).

Als „Standardtherapie“ gibt es heute drei verschiedene Therapieregime. Zum einen das CHOP-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison), basierend auf Doxorubicin, zum anderen ein intensiviertes Schema HyperVAD (Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin, Dexamethason, Cytarabin und

Methotrexat). Als drittes Schema findet sich Bendamustin. Das CHOP-Schema findet bei einem Ann-Arbor-Stadium III-IV Vorrang gegenüber den anderen beiden in Kombination mit Rituximab (Witzig et al., 2005).

Als große Weiterentwicklung in der Therapie des MCL hat sich die Hinzunahme des CD20-Antikörpers Rituximab zum normalen CHOP-Schema gezeigt. Es konnte in einer randomisierten Studie der *German Low Grade Lymphoma Study Group* (GLSG) initial gezeigt werden, dass sich die ORR und CR signifikant steigern ließen. Nach 65 Monaten konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich die mittlere TTF von 14 Monaten mit CHOP auf bis zu 28 Monate mit R-CHOP steigern lassen konnte (Lenz et al., 2005; Hoster et al., 2011).

Initiale Therapie des Mantelzell-Lymphoms

Welche Therapie zur Behandlung des MCL angewendet wird, entscheidet sich dadurch, ob es sich um Patienten handelt, die sich in einem akzeptablen Allgemeinzustand befinden und eine Hochdosis-Chemotherapie vertragen. Neben der Hochdosis-Chemotherapie ist auch relevant, in wie weit die Patienten für eine autologe Stammzelltransplantation in Frage kommen. So differieren die Therapieschemata stark. Die Standardtherapie des MCL bei jungen Patienten (Alter jünger 65 Jahre) ist die Induktionstherapie mit Hochdosis-Ara-C gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation (Geisler et al., 2008).

Die Therapie des Mantelzell-Lymphoms bei älteren Patienten

Gerade bei älteren Patienten (Alter über 60 Jahre), die körperlich noch in der Lage sind eine Chemotherapie zu erhalten, kommt R-CHOP zum Einsatz, wenngleich die Remission oftmals nur von kurzer Dauer ist. In einer großen randomisierten Studie der *European MCL Elderly* wurden sowohl zwei verschiedene Induktionsschemata, als auch zwei verschiedene Erhaltungstherapien miteinander verglichen. Folgende Kriterien führten zum Einschluss in die Studie: Patienten über 60 Jahre, Ann-Arbor Stadium II-IV und keine Zugänglichkeit für eine Hochdosis-Chemotherapie. Es konnte gezeigt werden, dass die Erhaltung mit Rituximab im Vergleich zu Interferon α bei den Patienten zu einer signifikant längeren Remission führen konnte. Nach 37 Monaten hatten die Patienten mit einer 2-monatlichen Gabe von 375 mg/m² Rituximab eine

signifikant längere Remissionszeit und Gesamtüberleben, als die Patienten, die Interferon α erhalten hatten (4-Jahres-Überleben 87% zu 63%). Gleichzeitig hat sich gezeigt, dass Patienten ohne Erhaltungstherapie ein schlechteres Outcome hatten (Kluin-Nelemans et al., 2012).

Auf diese Daten gestützt ist die Erhaltungstherapie mit Rituximab nach R-CHOP-Induktion Mittel der Wahl bei älteren Patienten, und auch für jüngere Patienten geeignet, die keine Stammzelltransplantation mehr erhalten können (Witzens-Harig et al., 2012; Hitz et al., 2013). Neben dem R-CHOP-Schema zeigt sich auch die Kombination von Bendamustin mit Rituximab als effektiv. In einer Studie mit 549 Patienten mit indolentem Lymphom, wovon 88 Patienten ein MCL aufwiesen, war die Ansprechrate von B-R identisch mit der von R-CHOP (93,8% gegenüber 93,5%). Allerdings war die CR-Rate mit B-R um etwa 10% höher. Auch das mittlere PFS war mit 54,8 Monaten mit B-R im Vergleich zu 34,8 Monaten mit R-CHOP sehr viel besser. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um die Ergebnisse einer Untergruppenanalyse handelt (Rummel et al., 2013).

Wenngleich diese Schemata durch große Studien gezeigt haben, dass für das MCL einige therapeutische Ansätze existieren, ist die Langzeitprognose des MCL immer noch nicht zufriedenstellend, so dass neue Therapieansätze dringend notwendig sind.

Für Patienten mit refraktärem oder rezidivierendem MCL hängt die herangezogene Therapie von der Möglichkeit einer Stammzelltransplantation ab. Patienten, die von ihrem Allgemeinzustand her in der Lage sind transplantiert zu werden, erhalten nach einer HDT eine ASCT, falls sie diese Therapie initial noch nicht erhalten hatten. Junge Patienten können von einer allogenen Stammzelltransplantation profitieren, wobei darauf zu achten ist, dass die Gefahr einer Graft-versus-Host-Reaktion oder von sekundären Infektionen besteht, welche das Outcome verschlechtern können. Falls eine Stammzelltransplantation keine therapeutische Möglichkeit darstellt, werden die Patienten innerhalb von Studien mit verschiedenen Therapieschemata behandelt. Neben R-CHOP, wird Bendamustin in Mono- und Kombinationstherapie mit Rituximab verwendet. Thalidomid, R-FC, R-FCM, Bortezomib in Mono- und Kombinationstherapie stellen weitere Behandlungsmöglichkeiten dar. Gerade in Fällen des rezidivierenden MCL kann mittels Chemotherapie nur eine kurze Remission erzielt

werden, so dass neue gezielte Therapien unabdingbar sind (Dreyling et al., 2014). Durch die sogenannte *targeted therapy* besteht die Möglichkeit mittels *small molecules* auf molekularer Ebene anzusetzen und so die Prognose des Mantelzell-Lymphoms zu verbessern. Neuere Medikamente, wie mTOR-Inhibitoren, CDK-Inhibitoren oder auch PI3K-Inhibitoren versprechen zusätzlich vielversprechende Ansätze (Hitz et al., 2013).

2. Molekulare Therapeutika

2.1 Der CDK4/6-Inhibitor Palbociclib

Wie oben beschrieben ist das Hauptcharakteristikum des MCL die Chromosomentranslokation t(11;14)(q13;q32), was zu einer Überexpression von Cyclin D1 führt. Für die Zellproliferation ist der Übergang von der G1-Phase in die S-Phase essentiell, in welcher die genetische Information dupliziert wird und eine Zellgeneration weitergegeben wird. Da dieser Punkt im Rahmen der Tumorphathogenese als kritisch anzusehen ist, wird der Übergang stark reguliert. Wichtige Transkriptionsfaktoren werden durch Cyclin D1 in Komplexbildung mit den cyclin-abhängigen-Kinasen 4 und 6 freigegeben, die von RB initial inhibiert werden und erst nach einer Hyperphosphorylierung von RB transkribiert werden können. Da im MCL die Konzentrationen, sowohl der CDKs als auch des Cyclin D1 signifikant erhöht sind, führt dies zu einer übermäßig gesteigerten Zellproliferation (Fernandez et al., 2005). Aufgrund dieses Pathomechanismus sind Inhibitoren des Zellzyklus, im Speziellen der CDKs, valide therapeutische Mittel, um die Zellproliferation zu vermindern und das Tumorwachstum zu hemmen.

Palbociclib hat sich als potenter und selektiver Inhibitor der CDK4 und CDK6 erwiesen. Palbociclib (PD 0332991), ist ein Pyrido[2,3-d]pyrimidin-Derivat mit hoher inhibitorischer Selektivität für CDK4 und CDK6. Durch die Inhibition der CDKs kommt es durch Palbociclib zu einer mangelnden Komplexbildung mit Cyclin D1, so dass die Zelle in der G1-Phase arretiert wird. Fry et al. konnten die Wirkung von Palbociclib initial *in vivo* im Mausmodell und *in vitro* an verschiedenen Tumorentitäten zeigen. Verschiedene Standardtumore wurden Mäusen eingepflanzt und nach einer täglichen Gabe von 150 mg Palbociclib untersucht. Hier hat sich eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung an den beiden Serin-Resten von RB gezeigt. Über die Herabsetzung der Phosphorylierung von RB an seinen 2 spezifischen Serin-Resten in Position 780 und 795, welche Substrat von CDK4/6 sind, konnte gezeigt werden, dass Palbociclib hier spezifisch als Inhibitor dieser Kinasen wirkt. Der IC_{50} in *MDA-MB-435 breast carcinoma cells* war für Serin⁷⁸⁰ 0,066 $\mu\text{mol/L}$ und für Serin⁷⁹⁵ 0,063 $\mu\text{mol/L}$,

wodurch sich Palbociclib als sehr potent erwiesen hat. Dadurch konnte eine Hemmung der Zellzyklusproliferation durch einen Arrest in der G1-Phase gezeigt werden. Bei einer Konzentration von 0,08 $\mu\text{mol/L}$ war eine Zunahme der G1-Phase von 20,8% zu verzeichnen. Durch diesen Zellzyklusarrest ist auch die Hemmung des Tumorwachstums zu erklären. Im Mausmodell mit einem *Colo-205 colon carcinoma*-Xenograft war eine signifikante Regression des Tumorwachstums zu ermitteln. In Rb⁻-Tumorzellen wurde keine Aktivität von Palbociclib festgestellt, was die spezifische Rolle in der Inhibition von CDK4/6 unterstreicht. Serin 780 und Serin 795 gelten als spezifisches Substrat der CDK4/6-Kinasen (Connell-Crowley et al., 1997), wodurch die Unwirksamkeit von Palbociclib in Rb⁻-Zellen erklärt werden kann (Fry et al., 2004). Auch durch eine Untersuchung der Expression von Genen, die unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors E2F stehen, konnte die spezifische Hemmung der Zellproliferation von Palbociclib gezeigt werden. Durch eine Phosphorylierung von RB löst sich die inhibitorische Bindung gegenüber E2F und gibt damit relevante Gene für die Zellzyklusproliferation frei. Im *Colo-205 human colon carcinoma* konnte durch den Einsatz von Palbociclib eine Herunterregulation der Expression der durch E2F-regulierten Gene *CDC2*, *CCNE2*, *TK1* und *TOP2A* gezeigt werden. Auch dies zeigt die spezifische Inhibition der CDKs 4/6 und dem damit verbundenen Ausfall der Phosphorylierung von RB (Fry et al., 2004).

Palbociclib hat sich *in vivo* als wirksam erwiesen. In ersten klinischen Studien sprachen Patienten ebenfalls gut auf die Behandlung mit Palbociclib an, allerdings zeigte sich hier teilweise keine Korrelation der molekularen Wirkung mit dem klinischen Ansprechen und dem progressionsfreien Überleben. Dieser Teil der Patienten entwickelte relativ frühzeitig eine Resistenz gegenüber der Behandlung mit Palbociclib (Leonard et al., 2012).

Deshalb könnte die langfristige Wirkung einerseits, und das Ansprechen auf die Behandlung mit Palbociclib andererseits, bei Patienten mit MCL durch die Hinzunahme eines weiteren Inhibitors verbessert werden.

2.2 Der B-Zell-Rezeptor und der BTK-Inhibitor Ibrutinib

2.2.1. Der B-Zell-Rezeptor

Durch Antigenbindung wird der B-Zell-Rezeptor (BCR) aktiviert, wodurch das intrazellulär gelegene *immuno-receptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) von CD79a und CD79b, zwei Bestandteile des BCR, durch Lyn und anderen src-Kinasen phosphoryliert wird (Choi et al., 2012). Intrazellulär wird nun die Syk-Kinase durch Bindung an die SH2-Domäne des durch Lyn doppelt phosphorylierten ITAMs in seiner Aktivität verstärkt. Über eine Phosphorylierung des BLNK (*B cell linker protein*) und anderen *second messengern* durch Syk kommt es schließlich zu einer Aktivierung von BTK (Rolli et al., 2002). Die *Bruton's Tyrosin Kinase* (BTK) ist ein zytoplasmatisches Protein aus der Familie der Tec-Kinasen, welche in Verbindung mit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) zu einer Aktivierung von PLC γ führt. Diese Kaskade führt letztendlich zu einem Calcium-Einstrom in die Zelle und zur Aktivierung der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *mammalian target of rapamycin* (mTOR), *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) und des *nuclear factor κ B* (NF- κ B)-Signalweges.

Dadurch wird direkt die Transkription im Zellkern beeinflusst, weiterhin auch die B-Zell-Proliferation, Differenzierung, Überleben und Migration (Herrera et al., 2014). In MCL-Zelllinien, als auch in MCL-Patientenproben, wurde eine Alteration der Src-Kinase Syk gefunden, ebenso auch eine Überexpression von Syk und BTK. Dies stellt einen wichtigen Pathomechanismus in der Entstehung des Mantelzell-Lymphoms dar (Cinar et al., 2013) (siehe Abbildung 2).

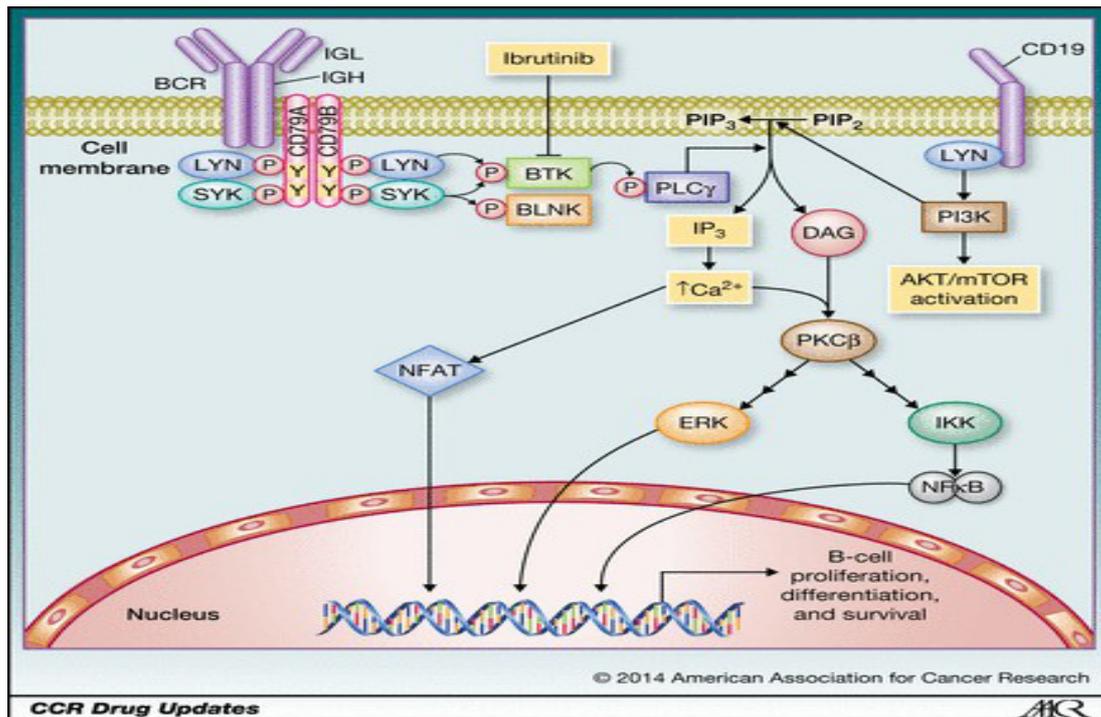


Abbildung 2: Schematische Darstellung des B-Zell-Rezeptors und seiner Signalkaskade

Der B-Zell-Rezeptor führt zu einer Aktivierung einer Signalkaskade, die sich positiv auf die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von B-Zellen auswirkt. BTK wird aktiviert und führt zur Phosphorylierung weiter abwärts gelegener Signalmoleküle. Dies führt schließlich zu einem direkten Einfluss auf die DNS der B-Zellen. BTK als wichtiger Baustein dieser Kaskade wird potent durch Ibrutinib gehemmt. Aus Herrera et al. 2014

2.2.2. Der BTK-Inhibitor Ibrutinib

Ibrutinib (PCI-32765) ist ein starker Inhibitor der BTK. Dieses *small molecule* bindet kovalent an einen Cystein-Rest (Cys-481) an der aktiven Seite des Enzyms und führt so zu einer starken und irreversiblen Inhibition (Pan et al., 2007). Honigberg et al. konnten zeigen, dass nach Stimulation des BCR-Signalweges neben der Autophosphorylierung von BTK auch die Phosphorylierung seiner Zielstruktur PLCγ durch den Einsatz von Ibrutinib inhibiert werden konnte. Auch die *extra-cellular signal-regulated kinase* (ERK), die sich dem Signalweg anschließt, konnte mittels Ibrutinib inhibiert werden. Gleichzeitig wurde die Aktivität der signal-aufwärts gelegenen Syk-Kinase nicht

beeinflusst (Honigberg et al., 2010). In präklinischen Studien hat der Einsatz von Ibrutinib bei *in vitro* MCL-Zellen die Phospho-BTK-Expression, also die aktivierte Form des BTK, vermindert. Zusätzlich wurde die Zellviabilität auch noch bei sehr geringen Konzentrationen von Ibrutinib gesenkt. Die Behandlung mit Ibrutinib führt weiterhin zu einer signifikanten Zunahme der Apoptose. Typische Apoptosemuster, wie Zellkernverkleinerung, Chromatinkondensation und zelluläre Dysintegration, waren bei den behandelten Zelllinien histologisch neben einer hohen Apoptoserate, die in der Analyse mittels Durchflusszytometrie dargestellt werden konnte, nachweisbar (Cinar et al., 2013).

Somit zeigt sich Ibrutinib als vielversprechendes Therapeutikum in der Behandlung des MCL. Dreyling et al. konnten in einer großen Phase 3-Studie bei Patienten mit MCL eine DOR von 58% nach 18 Monaten mit Ibrutinib erreichen. Allerdings zeigte sich bei einem Follow Up von 20 Monaten, dass 42% der Patienten, die mit Ibrutinib behandelt wurden, gestorben waren (Dreyling et al., 2016). Ähnliche Ergebnisse konnten auch Wang et al. zeigen (Wang et al., 2013). So schlägt Ibrutinib initial gut an, führt jedoch zu aggressiven Rezidiven im Verlauf. Die Verwendung von Ibrutinib in Kombinationstherapie könnte zu einem geringeren Auftreten dieser aggressiven Rezidive führen und eine längere Remission ermöglichen. Seit 2014 ist Ibrutinib in Europa zur Therapie des rezidivierenden bzw. refraktären Mantelzell-Lymphoms und der CLL zugelassen.

2.3 Der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg und der PI3K-Inhibitor Idelalisib

2.3.1 Der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg

Der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation, bei der Vermittlung der Apoptose und bei DNS-Reparaturvorgängen. Über Transmembranrezeptoren werden extrazelluläre Signale über PI3K und weitere Proteine nach intrazellulär weitergeleitet, wo sie ihre Wirkung entfalten (siehe Abbildung 3).

Es konnten drei verschiedene Klassen von PI3K identifiziert werden, die sich in ihrer Substratspezifität und strukturellen Gesichtspunkten unterscheiden. Klasse-I-PI3K sind momentan am besten verstanden und bestehen aus einer katalytischen Untereinheit p110, die wiederum aus drei Isoformen besteht (α , β und δ), und einer regulatorischen Einheit p85. Durch Stimulation der Rezeptortyrosinkinasen kommt es zur Autophosphorylierung und Bindung von PI3K an die Phosphotyrosine. Dadurch kommt es zur allosterischen Aktivierung der p110-Untereinheit und zur Bildung des *second messengers* Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat durch Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Das gebildete PIP3 führt Proteine mit Plecktrin-Homologie-Domäne, darunter AKT, an die Zellmembran, verankert sie hier und aktiviert sie dadurch (Fruman et al., 1998; Fresno-Vara et al., 2004). Mit annähernd 100 Substraten stellt AKT hier das zentrale Enzym im PI3K-AKT-mTOR-Signalweg dar (Carracedo et al., 2008). Wichtige Ziele von AKT sind unter anderem die I κ B-Kinase, die sich regulatorisch positiv auf NF κ B auswirkt, GSK-3 β , IRS-1 und neben mTOR die beiden Inhibitoren der cyclin-abhängigen-Kinasen p21^{WAF/kip1} und p27^{kip1}. AKT nimmt Einfluss auf den Zellzyklus, im Speziellen auf den Übergang der G1/S-Phase durch die Inaktivierung von GSK-3 β , durch einen Anstieg von Cyclin D1 und führt zusätzlich über weitere Mechanismen auch zu einer Reduktion von p27^{kip1} (Liang et al., 2003).

Ein sehr wichtiges Zielprotein von AKT, ist das *mammalian target of rapamycin* (mTOR). mTOR ist eine Serin-Threonin-Kinase, die zu einer Aktivierung und Synthese verschiedenster Proteine führt, die für den Zellzyklus, gerade auch für die Regulation von Cyclin D1, relevant ist. Auch die Angiogenese - vermittelt über HIF - wird durch mTOR beeinflusst. Embryonale Mutationen, die mTOR betreffen, sind nicht mit dem Leben vereinbar, was seine große Relevanz und Schlüsselstellung, generell und im Speziellen im PI3K-AKT-mTOR-Signalweg zeigt (Porta et al., 2014). In vielen Tumorentitäten des Menschen ist der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg dysreguliert und trägt so zur Pathogenese von Neoplasien bei. Auch in hämatoonkologischen Erkrankungen, wie auch im MCL, kommt es zu einem regelhaften Funktionsverlust dieses Signalwegs, der sich an verschiedenen Punkten im Pfad manifestieren kann (Witzig et al., 2006). Rizzatti et al. konnten mehrere, den PI3K-AKT-mTOR-Signalweg betreffende Gene identifizieren, die im Mantelzell-Lymphom aberrant exprimiert werden und dadurch den PI3K-AKT-mTOR-Signalweg empfindlich stören (Rizzatti et

al., 2005). Über eine dauerhafte Aktivierung tragen AKT als auch mTOR selbst, durch eine Inhibition der Apoptose auf der einen und einer Progression des Zellzyklus auf der anderen Seite zur Entstehung des MCL bei, unabhängig von anderen Signalmolekülen der Kaskade (Rudelius et al., 2006; Peponi et al., 2006).

Wie oben beschrieben, besteht die katalytische Untereinheit der Klasse-I-PI3Ks aus drei verschiedenen Isoformen (p110 α , β und δ). Die α - und β -Form kommt in vielen verschiedenen Zelltypen vor. Das Vorkommen des p110 δ beschränkt sich jedoch auf Zellen der hämatopoetischen Reihe, insbesondere in B-Zellen. Neben AKT ist auch die δ -Untereinheit der PI3K im MCL stark exprimiert und ist durch Phosphorylierung des Serins in Position 473 von AKT aktiv (Chiron et al., 2013).

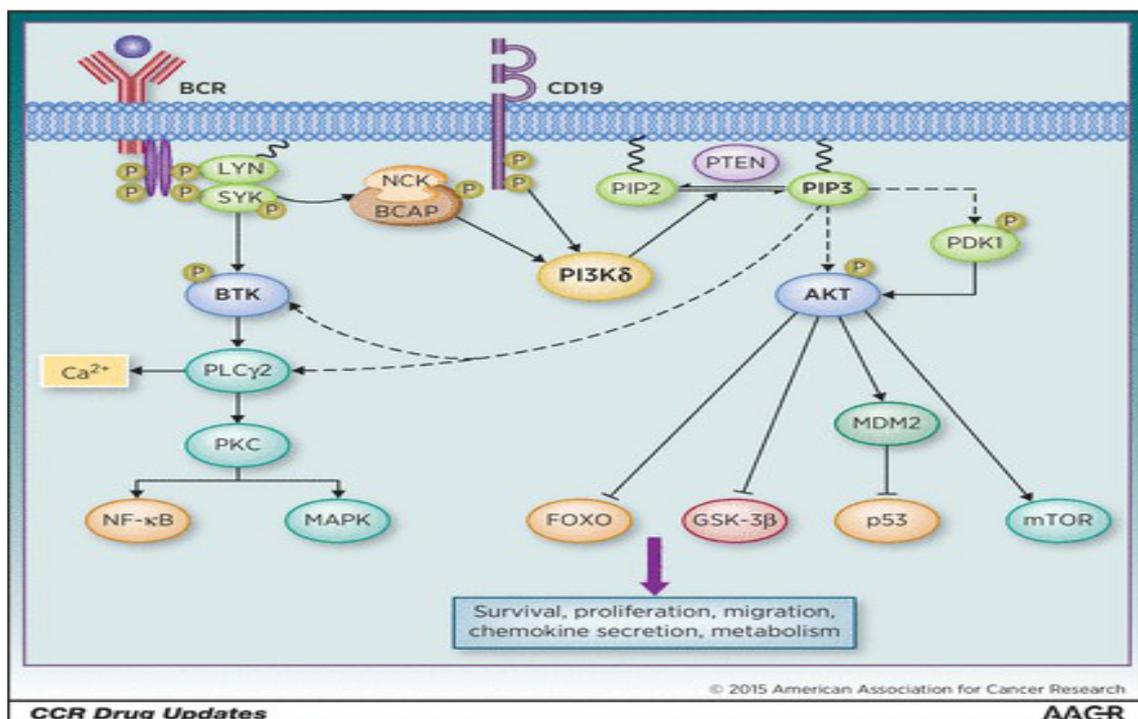


Abbildung 3: Der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg

Durch Aktivierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalweges kommt zu einer Regulation der B-Zelle hinsichtlich der Proliferation, des Metabolismus und anderer Faktoren, die die Zellintegrität aufrecht erhalten. Eng verzahnt ist dieser Signalweg mit dem BCR-Signalweg. Idelalisib hemmt hier potent die regulatorische Untereinheit p110 δ der PI3-Kinase. Aus Yang et al. 2015

2.3.2 Der PI3K-Inhibitor Idelalisib

Idelalisib (Früher GS-1101 oder CAL-101, 5-fluoro-3phenyl-2-[(S)-1-(9H-purin-6-ylamino)-propyl]-3H-quinazolin-4-one) ist ein potenter und selektiver Inhibitor der katalytischen Untereinheit p110 δ von PI3K. Lanutti et al. konnten zeigen, dass Idelalisib in B-Zell-Neoplasien eine 40- bis 300- fach höhere Selektivität gegenüber p110 δ als gegenüber den anderen Isoformen hat. Eine 400- bis 4000-fach höhere Selektivität zeigt Idelalisib gegenüber C2 β , DNA-PK und mTOR, einer wichtigen Zielstruktur des PI3K-Signalweges. Idelalisib senkt konzentrationsabhängig pAKT^{S473}, pAKT^{T308} und auch S6 signifikant, so dass die Inhibition von p110 δ zur Reduktion der erwähnten Proteine der PI3K-Signalkaskade führt.

5 von 5 MCL-Patientenproben exprimierten wesentliche Mengen von pAKT^{T308}, die durch Idelalisib dosisabhängig stark gesenkt werden konnten. (Unbehandelte Probe 100%, Idelalisib 0,1 μ M 40% und Idelalisib 1 μ M 30%). Auch pAKT^{S473} wurde mittels Idelalisib signifikant gesenkt (Unbehandelte Probe 100%, Idelalisib 0,1 μ M 20%). Weiterhin führte Idelalisib über die Inhibition von p110 δ zu einer starken Zunahme der Apoptose in Zelllinien, speziell dem diffus großzelligen Lymphom, dem Follikulären Lymphom und der B-ALL.

Idelalisib hat sich somit als starker Inhibitor der p110 δ -Untereinheit der PI3K gezeigt, die über eine signifikante Reduktion des phosphorylierten AKTs zu einem Rückgang der Wirksamkeit des PI3K-Signalweges führt. Der dadurch entstandene Verlust einer Proliferations- und Signalfunktion führt zudem zur Apoptose (Lanutti et al., 2001). In Deutschland ist Idelalisib zur Behandlung der CLL in Kombinationstherapie mit Rituximab und in Monotherapie beim Follikulären Lymphom zugelassen (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 23.12.2014).

Klinisch zeigte sich bei Patienten mit MCL unter der Behandlung mit Idelalisib nur eine kurzfristige Remission von 2,7 Monaten, so dass angenommen werden muss, dass das MCL frühzeitig Resistenzen entwickelt (Kahl et al., 2014).

Um dieser Resistenzbildung vorzubeugen und die Wirksamkeit von Idelalisib klinisch zu verbessern, erscheint es sinnvoll Idelalisib mit anderen Therapeutika zu kombinieren.

3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Diagnose Mantelzell-Lymphom geht auch heute noch mit einer äußerst schlechten Prognose einher. Bedingt durch ein schlechtes Ansprechen auf Chemotherapeutika und häufigen Rezidiven hat das MCL nur ein mittleres Überleben von 3-5 Jahren. Therapieansätze wie konventionelle Chemotherapie, Schemata mit Rituximab oder auch die allogene Stammzelltransplantation sind nicht hinreichend zufriedenstellend. Neue Substanzen sind in der Erprobung hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegenüber dem Mantelzell-Lymphom. Zu diesen neuen Substanzen zählen die sogenannten *small molecules*, die auf molekularer Basis in den Zellstoffwechsel eingreifen.

Ziel dieser Arbeit war es die Wirksamkeit des CDK4/6-Inhibitors Palbociclib auf MCL-Zelllinien *in vitro* zu untersuchen. Zum einen in Monotherapie und zum anderen auch in Kombinationstherapie mit anderen *small molecules*. Palbociclib wurde jeweils mit Ibrutinib, einem BTK-Inhibitor, und Idelalisib, einem PI3K-Inhibitor, kombiniert. Es wurde untersucht, ob Palbociclib einen G1-Arrest bei MCL-Zellen *in vitro* auslöst und ob die kombinierte Gabe eine Zunahme der Proliferationshemmung bewirkt. Zusätzlich wurde auch untersucht, ob die Kombinationstherapie sowohl den Zellzyklus, als auch die Apoptose positiv beeinflusst.

So wurde die Zellzahl mittels automatisiertem Trypan-Ausschluss-Test mit der Vi-Cell-Analyse zu unterschiedlichen Zeitpunkten in unterschiedlichen Dosierungen nach Behandlung mit Palbociclib, Ibrutinib und Idelalisib untersucht. Dadurch sollte eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt werden und zusätzlich die zeit- und dosisabhängige Zellzahlreduktion quantifiziert werden. Mittels der Fraction of Product Methode wurde die Interaktion der kombinierten Substanzen untersucht.

Weiterhin wurde mittels Propidium-Iodid-FACS der Effekt von Palbociclib in Mono- und Kombinationstherapie durchflusszytometrisch auf verschiedene MCL-Zelllinien analysiert. Entsprechend wurden die Ergebnisse der Zellzahlzählung und der FACS-Analyse korreliert.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zelllinien

Erwerb der Zelllinien	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
Granta 519, Jeko-1, Z 138, Rec-1, Maver-1, Mino-1 von:	American Type Culture Collection (ATCC)

4.1.2 Inhibitoren

Palbociclib (PD 0332991)	Pfizer, New York, USA
Ibrutinib (PCI 32765)	Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland
Idelalisib (CAL 101)	Gilead Sciences, Kalifornien, USA

4.1.3 Lösungen und Puffer

RPMI-1640	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
FKS	
DMSO	
DPBS	
Annexin V-PE	BD Biosciences Pharmingen
7-AAD (7-Amino-Actinomycin D)	BD Biosciences Pharmingen
Annexin V Binding Buffer	BD Biosciences Pharmingen
Lysis-Puffer für PI-Färbung	Selbst hergestellt aus:
	Aqua purificata 100ml
	Triton X-10 100µl
	Propidiumiodid 2 mg
	Natriumcitrat 100 mg
	pH 8,0 mit HCL

4.1.4 **Verwendete Geräte**

Vi-CELL XR	Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA)
Durchflusszytometer: BD FACS Calibur	BD Bioscience, Palo Alto, CA, USA
Centrifuge 5415D, Rotanta 46RC	Hettich Zentrifugen Eppendorf, Deutschland
Inkubationsschrank CO2-Auto-Zero	W.C. Heraeus GmbH Hanau, Deutschland

4.1.5 **Softwareprogramme**

ModFit LTTM	Verity Software House (Topsham, ME, USA)
MS Office 2007	Microsoft (Redmond, WA, USA)
FlowJo	Tree Star Inc. (San. Carlos, CA, USA)

4.2 Zellkultur

4.2.1 Zellliniencharakterisierung

Charakterisierung der MCL-Zelllinien

MCL-Zelllinien	Jeko-1	Granta 519	Mino-1	Maver-1	Rec-1	Z 138
Patientenalter	78	58	68	82	61	70
Patientengeschlecht	w	w	w	m	m	m
Verdopplungszeit	50h	49h	50h	48h	20-40h	18-24h
Entnahmeort	P	P	P	P	P	KM
t(11;14)(q13;q32)	+	+	+	+	+	+
Cyclin D1	+	+	+	+	+	++
Cyclin D2	-	-	-	n.a	n.a	-
Cyclin D3	+	-	-	n.a	n.a	n.a
Cyclin E	+	+	+	n.a	n.a	n.a
Rb	+	+	+	n.a	n.a	n.a
p16 ^{INK4a}	+	-	+	-	n.a	-
p21 ^{WAF/kip1}	+	+	+	-	n.a	n.a
p27 ^{Kip-1}	+	+	+	n.a	n.a	n.a
p53	-	+	++	+	n.a	+
TP53 Sequenz	WT	WT	M	M	WT	n.a

Abkürzungen: WT, wildtyp; M, mutiert; w, weiblich; m, männlich; P, peripheres Blut; KM, Knochenmark; n.a., nicht angegeben

Tabelle 1: Charakterisierung der MCL-Zelllinien nach Drexler et al., 2002; Amin et al., 2003; Estrov et al., 1998; Medeiros et al., 2006; Zamo et al., 2006; Tucker et al., 2006; DSMZ; ATCC

4.2.2 Zellkulturbedingungen

Die sechs etablierten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien (Granta 519, Jeko-1, Maver-1, Mino-1, Rec-1 und Z 138) wurden unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO₂-Gehalt und 95% relativer Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Die Zelllinien wurden alle in Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & CO, Nümbrecht) zusammen mit Medium bestehend aus 90% RPMI-1640 gemischt mit 10% fötalem Rinderserum (FCS) inkubiert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen entsprechend ihrer Dichte gesplittet und mit neuem Medium versetzt. Vor Verwendung wurde das FCS steril mittels eines Millipore-Filters filtriert und in 50 ml Falcons aliquotiert. Das RPMI-1640 Nährmedium wurde bei 4°C gelagert und vor dem Splitten im Wasserbad auf 37°C erhitzt, um den Zellen eine optimale Wachstumsbedingung zu gewährleisten. Danach wurde zum erwärmten RPMI-1640 das steril filtrierte FCS hinzugegeben und für die Zellkultivierung verwendet. Jeden Monat wurden die Zellen in neue Flaschen überführt und alle drei Monate wurden neu aufgetaute Zellen verwendet.

4.2.3 Einfrieren und Auftauen

Die einzufrierenden Zelllinien wurden bei 4°C für 5 min mit 1000 rpm abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgekippt wurde, wurde das Gesamtpellet mit einem Einfriermedium bestehend aus 90% FCS und 10% DMSO gelöst und je ein Milliliter respektive 1×10^7 Zellen in ein Kryoröhrchen überführt. Die gefüllten Kryoröhrchen wurden sofort bei -80°C eingefroren. Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen zunächst leicht im Wasserbad aufgetaut, bis die Suspension wieder in flüssiger Phase vorlag. Daraufhin wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt, welches mit 20 ml vorgewärmten Standardmedium (90% RPMI-1640 / 10% FCS) gefüllt war. Durch Zentrifugation bei Raumtemperatur für 5 min mit 1000 rpm wurden die Zellen vom zelltoxischen DMSO befreit und nach Verwerfen des Überstandes mit 20 ml frischem Standardnährmedium in neue Zellkulturflaschen überführt.

4.2.4 Zellquantifizierung mittels automatisierter Vi-Cell-Analyse

Der sogenannte Trypan-Ausschlusstest funktioniert nach dem Prinzip, dass sich nicht-viable Zellen mit Trypanblau anfärben lassen und sich so von ungefärbten viablen Zellen unterscheiden. Da lebende Zellen noch in der Lage sind, den Farbstoff Trypanblau aktiv nach Färbung wieder aus der Zelle zu sezernieren, erscheinen sie unter dem Mikroskop farblos. Nicht-viable Zellen verfügen aufgrund eines nicht mehr intakten Zellmembran-Transports über diesen Mechanismus nicht, werden durch Trypanblau angefärbt und erscheinen dunkel. Bei manueller Zählung wird eine entsprechende Probe in einer Neubauer-Zählkammer ausgewertet.

Die regelmäßige Analyse von Zellzahl und Viabilität erfolgte mittels automatisierter Vi-Cell-Analyse angelehnt an den eben beschriebenen Trypan-Ausschlusstest. Analog zur manuellen Zählung werden auch beim Vi-Cell nicht vitale Zellen mit Trypanblau angefärbt. Vor der regelmäßigen Nutzung muss das System vorher mit den zu untersuchenden Zellen geeicht werden. Die Zellsuspension wird automatisch angesaugt, gefärbt und dann durch eine Mikroskop-Durchflusskammer geleitet. Von dieser Probe werden daraufhin 100 Einzelaufnahmen gemacht und digital anhand der Bildanalyse ausgewertet. Hierbei wird das digitale Bild in eine Pixelmatrix umgewandelt und jedem Element der Aufnahme wird ein Helligkeitswert zugewiesen. Dieser erstreckt sich von 0 (schwarz) bis 255 (weiß). Zellen die Trypanblau aufgenommen haben, werden durch die Analyse als dunkel betrachtet und dementsprechend als nicht viabel klassifiziert. Entsprechend werden Zellen die einen hohen Helligkeitswert aufweisen als viabel eingestuft. Diese Daten zu absoluter Zellzahl, viabler Zellzahl und Viabilität werden automatisch erhoben und ausgewertet.

4.3 Zellzyklusanalyse mittels Propidium-Iodid-Färbung

Die zu untersuchenden Zellen wurden gezählt und auf eine Zellzahl von 1×10^5 Zellen gesplittet und in ein FACS-Röhrchen gegeben. Daraufhin wurde die Probe für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgekippt und noch einmal mit gekühltem DPBS (1,5 ml) gewaschen und wiederum der Überstand abgekippt.

Anschließend wurde das Zentrifugat mit 1 ml gekühltem Ethanol versetzt kurz gevortext und schließlich für 30 Minuten in einer Box mit Eis inkubiert.

Nach den 30 Minuten folgte eine erneute Zentrifugation bei Raumtemperatur, um das Ethanol zu entfernen. Nach zwei weiteren Waschungen mit DPBS wurde den Proben 50 µl einer 100 µg/ml konzentrierten RNase hinzugegeben. Im Anschluss wurde jede Probe noch mit 200 µl Propidium-Iodid versetzt und sofort in eine licht-undurchlässige Box gestellt, bis die entsprechende Untersuchung am FACS-Gerät durchgeführt wurde. Je Probe wurden mindestens 10.000 Zellen im Durchflusszytometer detektiert. Zur Auswertung wurde das Programm ModFit LTTM verwendet, welches mittels Histogramm-Darstellung die Zellen je nach Grad ihrer Fluoreszenz aufgetragen hat. Die X-Achse hat den Kanal FL-2 und damit die Fluoreszenz-Intensität der Zellen dargestellt. Auf der Y-Achse wurde die Anzahl der Zellen aufgetragen entsprechend ihrer Intensität. Nach der Auswertung entstand ein Bild mit zwei Hauptpeaks, wobei der erste Peak die Zellen in der G0/G1-Phase darstellte, der zweite Peak die Zellen in der G2/M-Phase. Die Zellen, die sich zwischen diesen beiden Peaks befanden, wurden als Zellen in der S-Phase angesehen.

4.4 Apoptosedetektion mit Annexin V-PE und 7-AAD Färbung

Um die Zellen in ihrer Viabilität zu differenzieren und Aussagen über den Anteil apoptotischer oder nekrotischer Zellen zu machen, wurde das Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I von BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Die Zellen werden mittels zweier Farbstoffe fluoreszenzmarkiert und ausgehend von der Kombination dieser Markierung in vitale (Annexin V-PE negativ, 7-AAD negativ), frühapoptotisch (Annexin V-PE positiv / 7-AAD negativ) und spätapoptotischen Zellen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD positiv) eingeteilt. Für das Apoptoseassay wurden die Zellen gezählt, auf 1×10^6 Zellen gesplittet und bei 1500 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS bei gleichen Bedingungen wurden pro Probe 100 µl eines 1/10 verdünnten Bindingpuffers hinzugegeben und mit je 5 µl Annexin V-PE und 7-AAD versetzt. Nach kurzem Vortexen zum Vermischen folgte eine

15 minütige Inkubationszeit. Anschließend wurden 400 µl Bindingpuffer hinzugegeben und die Zellen untersucht.

4.5 Gewinnung von B-Zellen aus humanem Blut mittels Ficoll Methode

Gesunde B-Zellen wurden mittels Ficoll und Dichtegradientenzentrifugation aus humanem Blut gewonnen. Dazu wurde das Blut in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und 1 zu 1 mit RPMI-1640 verdünnt. Ein Teil Ficoll wurde in ein 50 ml Falconröhrchen gefüllt und hierauf zwei Teile verdünntes Blut vorsichtig aufpipettiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei 900g, Raumtemperatur und ohne Bremse konnte der sogenannte "*Buffy Coat*", also die feine Schicht oberhalb der Ficollphase, abpipettiert werden und zusammen mit RPMI-1640 in ein Falconröhrchen gegeben werden. Um die Zellen von toxischen Ficollresten zu befreien wurde daraufhin mit 300g und 4 C° für 10 min zentrifugiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden anschließend in ein Medium mit RPMI-1640 und 20% FCS gegeben und unter Standardbedingungen kultiviert.

4.6 Berechnung der Fraction of Product

Um herauszufinden, ob die Kombinationstherapie der Medikamente synergistische, additive oder auch antagonistische Effekte zeigt, wurde die Fraction of Product Methode verwendet. Dazu wurden die Zellen mit einer Dichte von $0,2 \times 10^6/\text{ml}$ mit den Medikamenten inkubiert und mittels Vi-Cell-Analyse die Zellviabilität zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24, 48 und 72 Stunden) gemessen. Dabei wurde Palbociclib mit 62,5 nM, Ibrutinib mit 5 µM und Idelalisib mit 5 µM verwendet. Um nun die Formel der Fraction of Product nach Webb verwenden zu können, wurden die relativen Zellzahlen ins Verhältnis zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle gesetzt und als Prozentwert angegeben (fraction affected, FA).

Diese Werte wurden anschließend in der Formel nach Webb verrechnet (Webb et al., 1963):

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

Die Kombination der Medikamente wurde bei Werten über 0,1 als synergistisch, Werte unter – 0,1 als antagonistisch angesehen. Werte die zwischen 0,1 und – 0,1 lagen wurden als additiv bewertet.

5. Ergebnisse

5.1 Der CDK4/6-Inhibitor Palbociclib

5.1.1 Dosisabhängige Proliferationshemmung in MCL-Zelllinien

In einem initialen Experiment wurde das Ansprechen von Palbociclib auf die sechs MCL-Zelllinien (Maver-1, Rec-1, Granta 519, Jeko-1, Mino-1, Z 138) untersucht. Hierbei wurden die Zellen mit einer Ausgangszelldichte von $0,2 \times 10^6$ Zellen pro ml ausgesät und mit fünf verschiedenen Dosen von Palbociclib (125 nM, 62,5 nM, 12,5 nM, 6,25 nM, 1,25 nM) inkubiert. Eine unbehandelte Kontrolle wurde ebenfalls inkubiert, um einen Referenzwert zu haben. Nach 72 Stunden Expositionszeit wurde mittels Vi-Cell-Analyse die Zellzahl ermittelt.

Hierbei zeigte sich sowohl eine intra- als auch interindividuelle Wirkung von Palbociclib auf die einzelnen Zelllinien in Abhängigkeit der verwendeten Konzentrationen. Die beiden Zelllinien Rec-1 und Granta 519 zeigten sich relativ resistent gegenüber dem CDK4/6-Inhibitor, unabhängig von der verwendeten Dosis. Alle anderen untersuchten Zelllinien zeigten sich empfindlicher auf die Behandlung mit Palbociclib.

Rec-1 zeigte nach 72 stündiger Expositionszeit mit der höchsten Dosis von 125 nM eine Viabilität von 55,5% bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Bei der niedrigsten Konzentration von 1,25 nM konnte nur noch eine Reduktion um 16,4% auf 83,6% erreicht werden. Auch mit einer höheren Konzentration von 12,5 nM blieb die Viabilität mit 87,5% nahezu unverändert und zeigte ebenfalls eine geringe Inhibition.

Granta 519 hingegen hat etwas besser angesprochen, jedoch konnte erst ab einer Konzentration von 12,5 nM eine Reduktion der Viabilität auf 86,8% erreicht werden. Geringere Konzentrationen führten zu keiner nennenswerten Wirkung. Mit der höchsten Dosis von 125 nM waren noch 47,6% der Zellen viabel.

In den empfindlicheren Zelllinien Mino-1 und Z 138 konnte durch Palbociclib eine stärkere Inhibition erreicht werden. Bei der Zelllinie Z 138 hat sich allerdings erst mit einer verwendeten Konzentration von 62,5 nM ein Effekt gezeigt, der dafür auch zu

einer maximalen Reduktion von nur noch 19,1 % viable Zellen geführt hat. Bei niedrigeren Konzentrationen zeigte sich nur eine Reduktion der Viabilität im Mittel auf 80% bis 90% vitaler Zellen.

Mino-1 hat schon bei 12,5 nM einen Effekt gezeigt, bei welchem noch 70% der Zellen viabel waren. 34,9% Viabilität wurden mit der maximalen Konzentration von 125 nM erreicht. Eine Reduktion auf etwa 50% zeigten die Zellen bei der Hälfte der verwendeten Maximalkonzentration (43,2% bei 62,5nM).

Bei den beiden Zelllinien Maver-1 und Jeko-1 konnte ebenfalls eine Sensibilität gegenüber Palbociclib festgestellt werden. Bei Maver-1 zeigte sich wie bei Z 138 erst eine Wirkung bei einer verwendeten Konzentration von 62,5 nM. Dies konnte eine Reduktion der Viabilität auf 31,5% bewirken.

Jeko-1 hingegen hat bei allen verwendeten Dosen eine Reduktion gezeigt, die sich bis auf 28,5% viable Zellen mit 125 nM Palbociclib steigern ließ. In Anbetracht der ermittelten Werte zeigte sich die Dosis von 62,5 nM gut wirksam bei allen verwendeten Zelllinien. Die Dosis von 62,5 nM entsprach hier im Mittel bei den meisten Zellen dem IC_{50} .

Somit hat sich Palbociclib in der Inhibition der Zellproliferation als gut wirksam gezeigt. Vor allem in höheren Dosierungen konnte die Proliferation der Zelllinien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant gesenkt werden (siehe Abbildung 4).

Nach diesem initialen Experiment zur Dosisfindung von Palbociclib wurden von den sechs Zelllinien drei ausgewählt, welche eine konstante Dosis-Wirkungs-Beziehung aufwiesen. Desweiteren sollten alle drei ausgewählten Zelllinien einen möglichst gleichen IC_{50} haben und sich gegenüber dem Ansprechen von Palbociclib unterscheiden. Somit wurde Granta 519 als resistenter Zelllinie ausgewählt. Mino-1 zeigte sich auf die Behandlung von Palbociclib am sensibelsten. Jeko-1 hat sich nach diesen ersten Ergebnissen zwischen Granta 519 und Mino-1 eingereiht. Alle drei Zelllinien haben ihren IC_{50} bei ungefähr 62,5 nM Palbociclib und weisen eine konstante Dosis-Wirkungs-Beziehung auf.

Granta 519, Jeko-1 und Mino-1 erfüllten alle die oben genannten Kriterien und wurden für die weiteren Versuche mit Palbociclib, Ibrutinib und Idelalisib in Mono- und Kombinationstherapie verwendet.

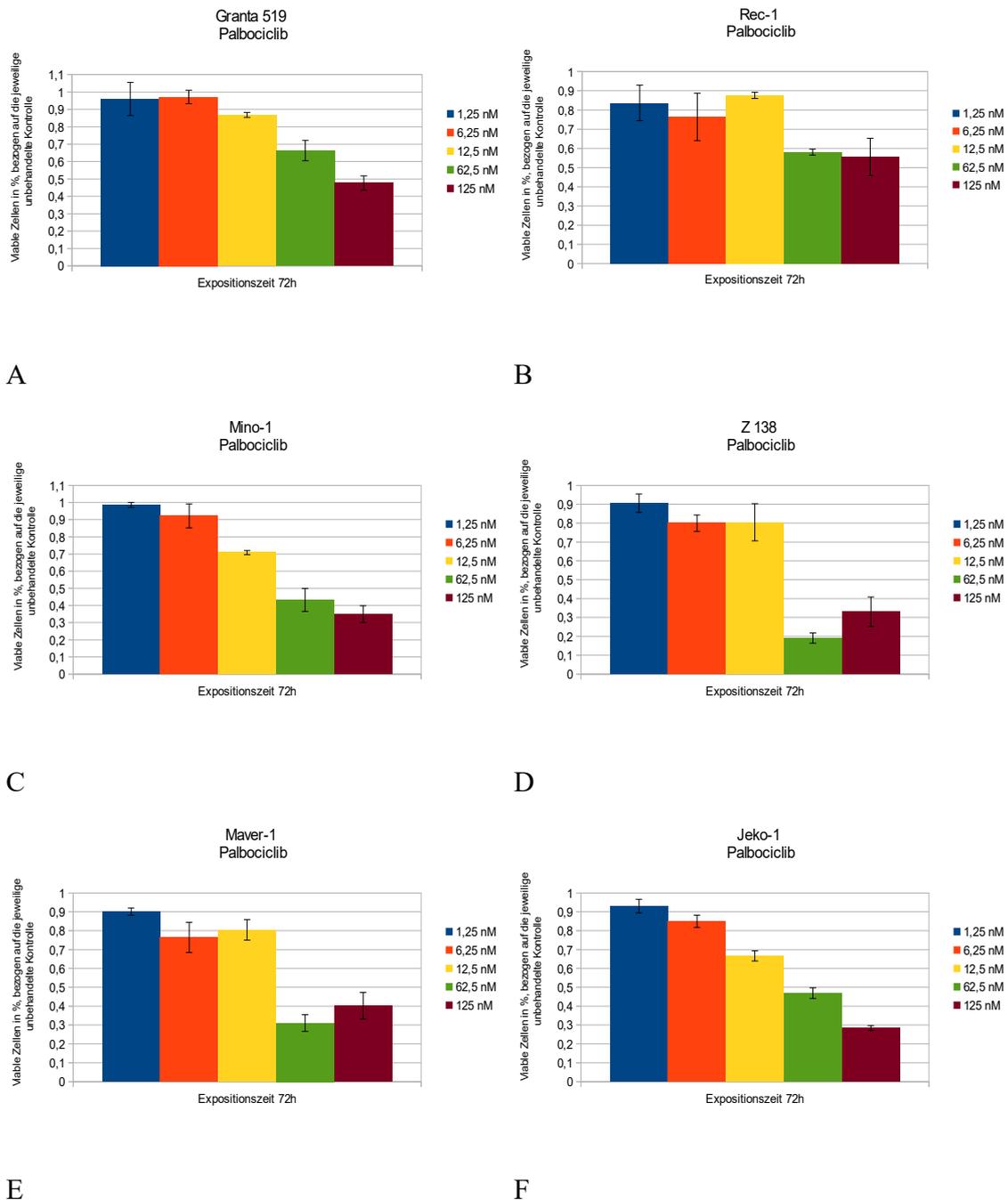


Abbildung 4: Dosisabhängige Proliferationshemmung durch Palbociclib

Sechs Mantelzell-Lymphom-Zelllinien wurden mit einer Zelldichte von $0,2 \times 10^6/\text{ml}$ ausgesät und über 72 Stunden mit Palbociclib kultiviert. Palbociclib wurde dabei in 5 verschiedenen Dosen gegeben. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mittels automatisiertem Vi-Cell-Trypanblau-Ausschlusstest gezählt und ihre Viabilität bestimmt. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Granta 519 (A), Rec-1 (B), Mino-1 (C), Z 138 (D), Maver-1 (E) und Jeko-1 (F).

5.1.2 Zeitabhängige Proliferationshemmung in MCL-Zelllinien

Um die zeitabhängige Wirkung von Palbociclib zu untersuchen wurden die Zellen über 72 Stunden mit der Dosis von 62,5 nM inkubiert und nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden gezählt. Während Mino-1 und Jeko-1 ähnliche Ergebnisse zeigten und sensibel auf Palbociclib reagierten, erwies sich Granta 519 durchgehend über die ganzen 72 Stunden als resistenter. Die stärkste Hemmung im zeitlichen Kontext war bei Mino-1 zu erkennen, die nach 24 Stunden nur noch 71,3% lebende Zellen aufwies und dann nach 72 Stunden eine Reduktion auf 37,5% vitale Zellen zu zeigen. Granta 519 hingegen zeigte nach 24 Stunden nur eine leichte Reduktion von 6,1% auf 93,9% viable Zellen, wobei im Verlauf nach weiteren 24 Stunden die Reduktion bis auf 58% viable Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ansteigen konnte. Granta 519 zeigte also nach initialer Resistenz einen starken Zuwachs der Inhibition nach 48 Stunden. Nach 72 Stunden waren noch 48,9% der Zellen viabel. Jeko-1 hat ähnliche Ergebnisse wie Granta 519 gezeigt, wobei der Wert nach 24 Stunden mit 87,7 % leicht besser war. Nach 48 Stunden zeigte sich die Inhibition nahezu gleich (57,2%), um bei 72 Stunden mit 43,5% nochmals einen stärkeren Zuwachs zu verzeichnen (siehe Abbildung 5).

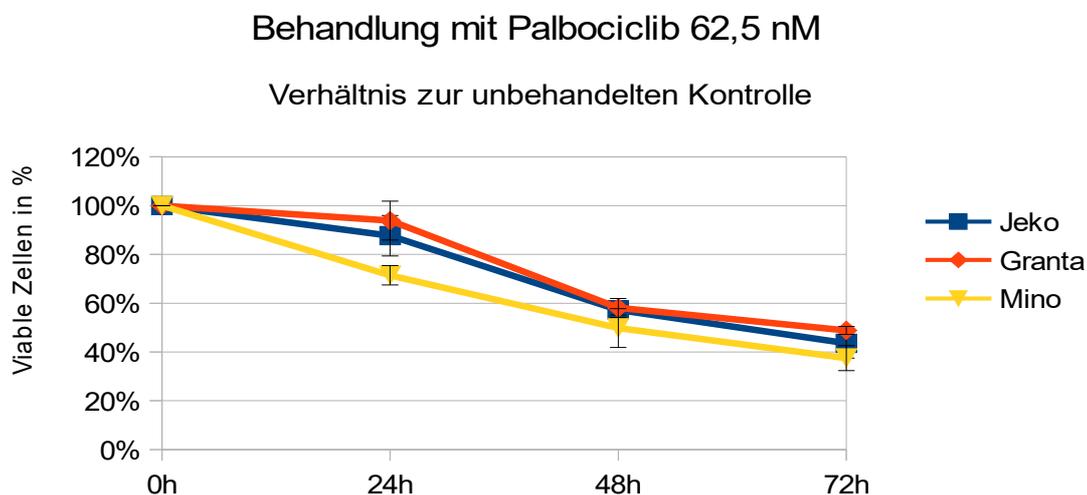


Abbildung 5: Zeitabhängige Proliferationshemmung mit Palbociclib mit 62,5 nM

Die drei Zelllinien Granta 519, Jeko-1 und Mino-1 wurden mit 62,5 nM Palbociclib inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden gezählt. Dargestellt sind die viablen Zellen bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert.

Abbildung 6 verdeutlicht die zeitabhängige Proliferationshemmung durch Palbociclib. Die Viabilität der Zellen ist hier im Verhältnis zur Ausgangszelldichte dargestellt. Es zeigte sich bei allen drei untersuchten Zelllinien (Jeko-1, Granta 519 und Mino-1) eine deutliche Proliferationshemmung. Nach 24 Stunden zeigte sich noch kein nennenswerter Unterschied in der Proliferationshemmung zur unbehandelten Kontrolle. Im Vergleich zur Ausgangszelldichte verzeichneten die beiden sensibelsten Zelllinien Jeko-1 und Mino-1 nach insgesamt 72 Stunden einen Zellproliferationsanstieg von 121%. Granta 519 zeigte hier eine stärkere Zunahme der Proliferation. Nach 48 Stunden lag die Wachstumsrate bei 51%, die nach weiteren 24 Stunden relativ stark auf insgesamt 149% anstieg. Durch die Behandlung mit Palbociclib konnten die Zellen nach 72 Stunden allerdings um mehr als das Doppelte in ihrer Proliferation gehemmt werden. Jeko-1 sprach dabei am stärksten auf die Behandlung mit einem Unterschied von 364% im Vergleich zur Kontrolle an. Granta 519 und Mino-1 konnten ebenfalls signifikant im Zellwachstum gehemmt werden (288% und 299%).

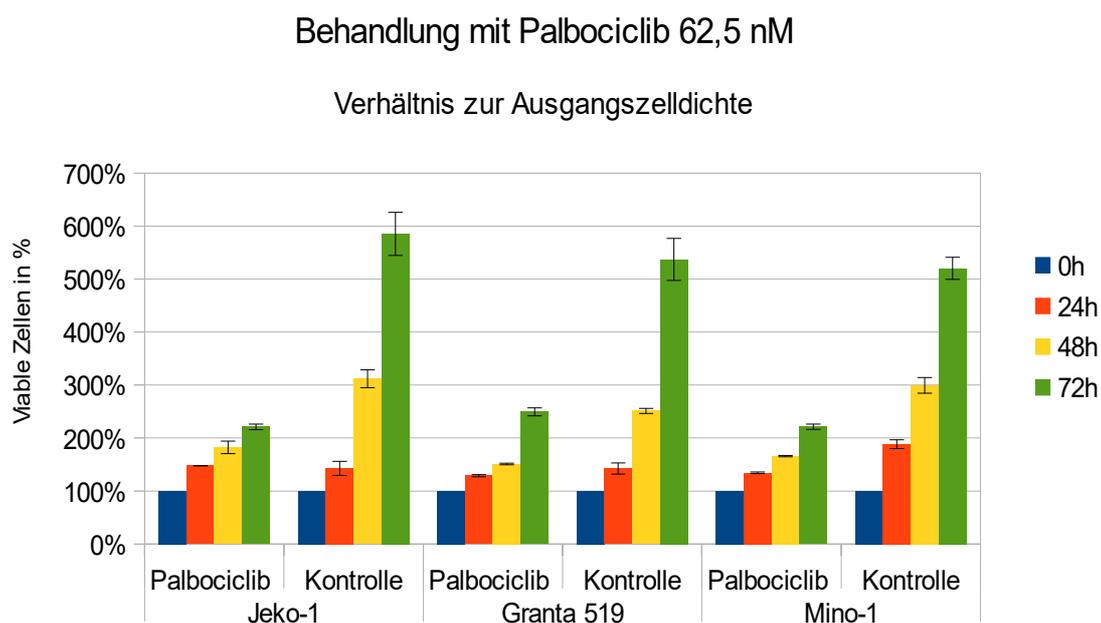


Abbildung 6: Zeitabhängige Proliferationshemmung mit Palbociclib mit 62,5 nM

Die drei Zelllinien Granta 519, Jeko-1 und Mino-1 wurden mit 62,5 nM Palbociclib inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden gezählt. Dargestellt sind die viablen Zellen bezogen auf die Ausgangszelldichte.

Palbociclib hat somit eine gute proliferationshemmende Wirksamkeit gezeigt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnte das Wachstum von allen drei MCL-Zelllinien im zeitlichen Verlauf signifikant reduziert werden.

5.1.3 Auswirkungen von Palbociclib auf den Zellzyklus

Um die Wirkung des Inhibitors Palbociclib auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurde eine FACS-Analyse nach 24 Stunden Inkubationszeit mit 62,5 nM Palbociclib durchgeführt. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen mittels Durchflusszytometer analysiert. In allen drei Zelllinien hat sich eine starke Verschiebung der einzelnen Phasen des Zellzyklus gegenüber der unbehandelten Kontrolle gezeigt.

Bei der Zelllinie Mino-1 zeigte sich der größte Zuwachs in der G0/G1-Phase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der prozentuale Anteil der G0/G1-Phase mit 62,5 nM Palbociclib betrug 95,7%, während bei der unbehandelten Kontrolle nur 44% zu verzeichnen war. Dies macht einen Zuwachs der G0/G1-Phase von 41,7% aus. Gleichzeitig hat sich der Anteil sowohl der S- als auch der G2-Phase stark zu Gunsten einer Zunahme der G0/G1-Phase verringert. Initial betrug die S-Phase der unbehandelten Kontrolle 51,8% und konnte durch Hinzunahme von Palbociclib auf 2,2% gesenkt werden. Die G2-Phase hat hier auch stark abgenommen. Granta 519 sprach insgesamt schlechter an, wobei immer noch eine Zunahme der G0/G1-Phase auf 62,6% unter der Behandlung mit Palbociclib von ursprünglich 30,9% bei der unbehandelten Kontrolle erreicht wurde. Auch hier geht die Zunahme der G0/G1-Phase mit einer starken Reduktion der S-Phase einher. Die G2-Phase wurde hier kaum beeinflusst (21,1% behandelt zu 22,6% unbehandelt). Hingegen wurde fast ausschließlich der Anteil der S-Phase von 47,1% auf 16,2% gesenkt, was im wesentlichen die gesamte Zunahme der G1-Phase ausmachte. Die unbehandelte Kontrolle von Jeko-1 zeigte initial einen G1-Anteil von 47,5%. Durch die Behandlung mit Palbociclib wurde der Anteil der G1-Phase auf 85,7% verschoben. Die Arretierung vollzog sich wiederum durch eine Abnahme der S-Phase von 44,7% auf 7,2% mit Palbociclib. Zusätzlich wurde bei keiner Zelllinie ein Messung im Sub-G1-Bereich detektiert, der für apoptotische Zellen steht.

Bei allen untersuchten Zelllinien konnte durch Palbociclib eine signifikante Zunahme der G0/G1-Phase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verzeichnet werden (siehe Abbildung 6 und 7).

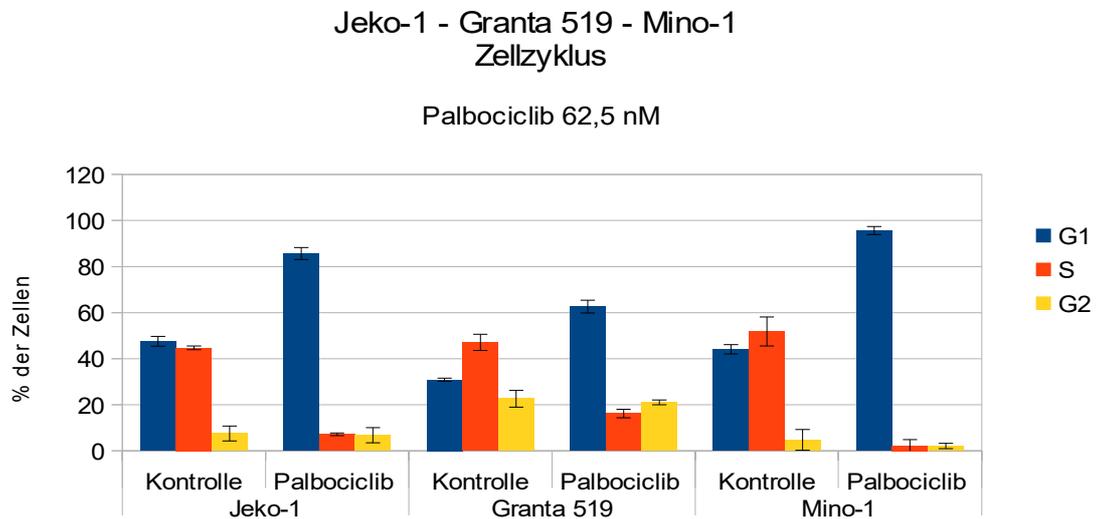


Abbildung 6: Zellzyklusanalyse via PI Färbung

Analysiert wurde der Zellzyklus bei den Zelllinien Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 nach 24 Stunden mit Palbociclib mit einer Dosis von 62,5 nM. Gezeigt sind die prozentualen Veränderungen der Zellphasen mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten

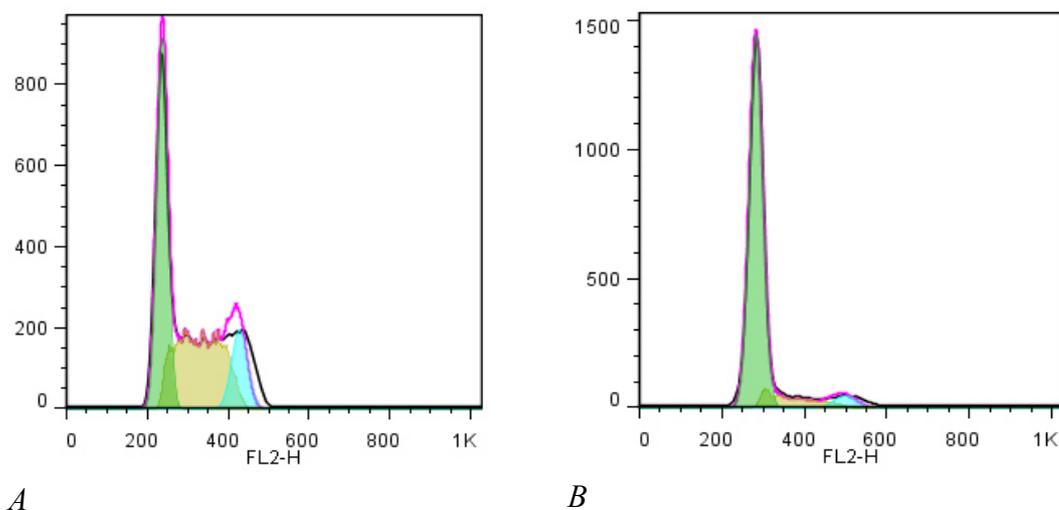


Abbildung 7: Zellzyklusanalyse mittels PI Färbung

Representatives Histogramm (x-Achse: FL-2 linear, y-Achse: Events) für Mino-1 unbehandelt (**A**), sowie 24 Stunden (**B**) nach Exposition mit 62,5 nM Palbociclib. Der erste Peak stellt die Zellen der G0/G1-Phase dar, der zweite Peak Zellen, die sich in der G2/M-Phase befinden. Dazwischen liegen die Zellen, die sich in der S-Phase befinden. Sehr gut erkennbar ist die signifikante Zunahme der Zellen in der G1-Phase verbunden mit einer starken Abnahme der Zellen in der S- bzw. G2/M-Phase. Dies weist auf einen Arrest in der G1/S-Phase hin.

5.1.4 Apoptoseinduktion durch Palbociclib

Die drei MCL-Zelllinien wurden mittels Annexin V-PE und 7-AAD daraufhin untersucht, ob durch Palbociclib eine Apoptose induziert wird. Nach Inkubation mit 62,5 nM Palbociclib wurden die Zellen nach 24 Stunden im Durchflusszytometer untersucht und ausgewertet. Durch die Doppelfärbung mit Annexin V-PE und 7-AAD kann zwischen vitalen Zellen (Annexin V-PE und 7-AAD beide negativ), frühapoptotischen Zellen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD negativ) und spätapoptotischen Zellen (Annexin V-PE und 7-AAD beide positiv) unterschieden werden.

Durch die Verwendung von Palbociclib konnte kein Zugewinn der Apoptoserate erreicht werden. In den Zelllinien Mino-1 und Jeko-1 lag die Rate an viablen Zellen bei der unbehandelten Kontrolle bei 86,5% und 92,6%. Die mit Palbociclib behandelten Zellen

zeigten einen viablen Anteil von 86,5% bei Mino-1 und 93,1% bei Jeko-1. Die Zelllinie Granta 519 zeigte schon bei der unbehandelten Kontrolle nur noch eine viable Fraktion von 67,4%. Jedoch hat sich der Wert nicht signifikant von den behandelten Zellen unterschieden, die einen Anteil von 72,5% lebenden Zellen zeigten. Insgesamt zeigte sich also bei Mino-1 eine Erhöhung des Anteils lebender Zellen, trotz Behandlung mit Palbociclib. Nur bei Granta 519 hat sich die Viabilität um 5,1% unter Verwendung von Palbociclib gering gesenkt.

Durch die Verwendung von 62,5 nM Palbociclib konnte in den drei untersuchten Zelllinien somit keine Apoptose induziert werden (siehe Abbildung 8 und 9).

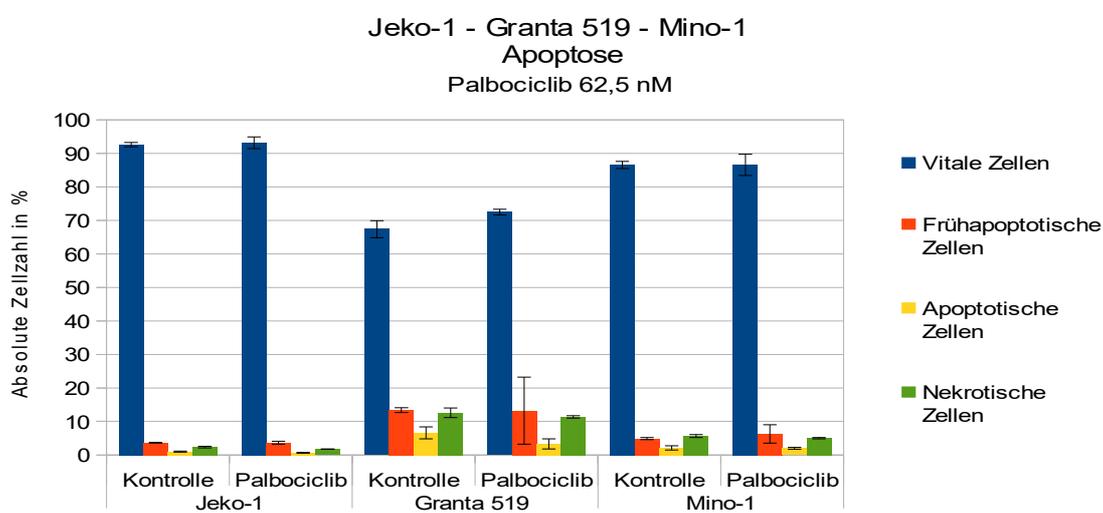
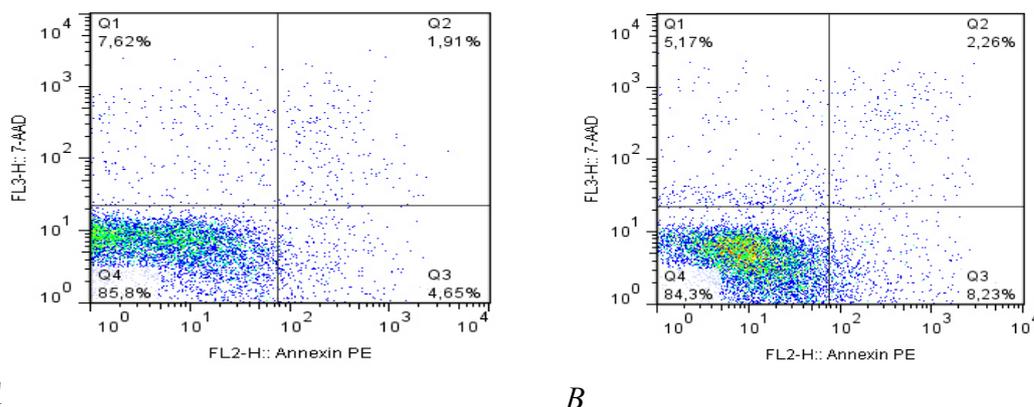


Abbildung 8: Apoptoseverhalten der MCL-Zelllinien unter 62,5 nM Palbociclib

Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 wurden mit 62,5 nM Palbociclib inkubiert und nach 24 Stunden einer FACS-Analyse hinsichtlich ihres Apoptoseverhaltens unterzogen. Es sind vitale, frühapoptotische, apoptotische und nekrotische Zellen jeweils der unbehandelten Kontrolle und der behandelten Zellen gegenüber gestellt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten



A

B

Abbildung 9: Apoptosedetektion mittels Annexin V-PE und 7-AAD-Färbung

Representative Dot-Blots von Mino-1 unbehandelt (A) und nach 24 Stunden (B) Expositionszeit mit Palbociclib in einer Dosierung von 62,5 nM. Im unteren linken Quadranten finden sich die intakten viablen Zellen (Annexin V-PE negativ, 7-AAD negativ), im unteren rechten Quadranten frühapoptotische Zellen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD negativ) und im oberen rechten Quadranten spätapoptotische Zellen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD positiv). Es zeigt sich deutlich, dass es durch die Verwendung von Palbociclib zu keiner Verschiebung der intakten viablen Zellen zu einer Apoptose gibt.

5.1.5 Wirkung von Palbociclib auf gesunde humane B-Zellen

Um die Wirkung von Palbociclib auf gesunde B-Zellen zu untersuchen und eine etwaige Toxizität zu entdecken, wurden B-Zellen von zwei gesunden Probanden mittels Ficoll isoliert und mit fünf verschiedenen Konzentrationen von Palbociclib inkubiert. Die verwendeten Konzentrationen waren hier 5 nM, 50 nM, 500 nM, 5 μ M und 10 μ M, um auch eine etwaige Wirkung zu erzielen, die erst in sehr hohen Dosen auftreten würde. Die Zellen wurden nach 24, 48, und 72 Stunden mittels Vi-Cell gezählt. Zur Kontrolle wurde die Mantelzell-Lymphom-Zelllinien Jeko-1 ebenfalls mit den erwähnten Konzentrationen inkubiert und gleichermaßen verfahren.

Es hat sich gezeigt, dass die Wirkung von Palbociclib auch bei den gesunden B-Zellen eine Proliferationshemmung induziert, allerdings im Vergleich zur MCL-Zelllinie Jeko-1 in sehr viel geringerem Ausmaß. Bei beiden gesunden Patientenproben konnte mit

einer Konzentration von 5 μM die größte Reduktion der Zellzahl bewirkt werden. Es konnte eine Hemmung in der Proliferation nach 72 Stunden von 68,7% und 61,7% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gezeigt werden. Initial zeigt sich nach 24 Stunden in beiden Proben mit allen Konzentrationen kaum ein Ansprechen auf Palbociclib, nach 48 Stunden allerdings kommt es zu einer erneuten Wachstumszunahme bei fast allen Konzentrationen. Die MCL-Kontrollzelllinie zeigt ein zu erwartendes Ergebnis. Sowohl zeit- als auch dosisabhängig zeigte sich eine relativ starke Proliferationshemmung, die nach 72 Stunden ihr Maximum bei 22,7% erreichte mit der Höchstkonzentration von 10 μM (siehe Abbildung 10).

Die Probandenproben wurden durch Palbociclib kaum in ihrer Proliferation gehemmt. Nur in sehr hohen Dosierungen konnte eine leichte Reduktion der Wachstumsrate erzielt werden, die aber weit hinter der Reduktion der MCL-Zelllinie Jeko-1 als Kontrolle blieb.

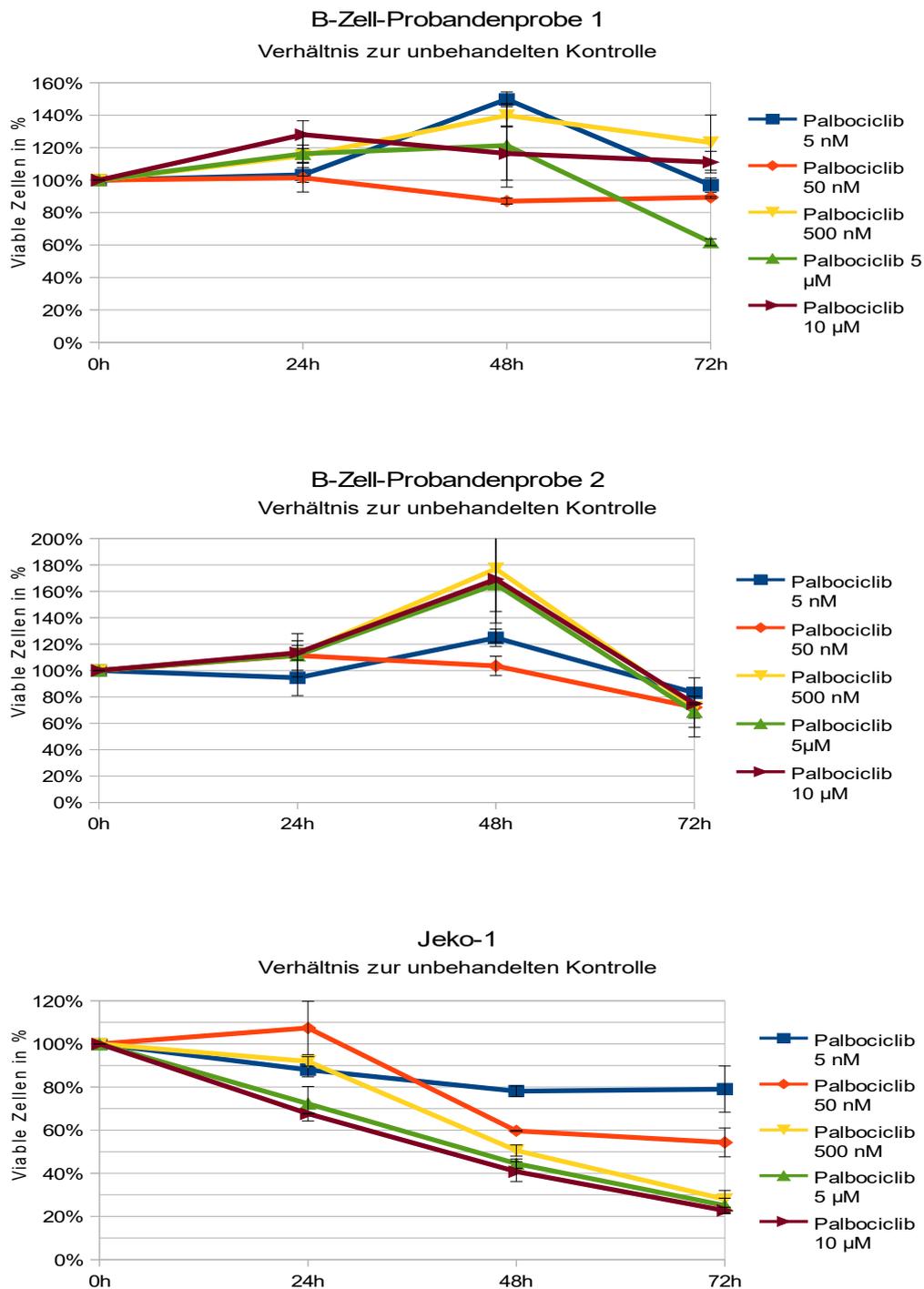


Abbildung 10: Wirkung von Palbociclib auf gesunde B-Lymphozyten

Die B-Zellen zweier gesunder Probanden wurden mit verschiedenen Konzentrationen Palbociclib inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden gezählt. Als Kontrolle diente die Mantelzell-Lymphom-Zelllinien Jeko-1. Viable Zellen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten

Die Probandenproben zeigten auch im Verhältnis zur Ausgangszelldichte keine signifikante Veränderung in der Wachstumsrate. Die Proliferationshemmung durch Palbociclib in einer Dosierung von 50 nM zeigte bei der ersten Probe eine Reduktion um 40% nach 48 Stunden, um nach 72 Stunden wieder auf 83% anzusteigen. Nur in der Dosierung von 5 μ M lag der prozentuale Anteil an viablen Zellen bei 60%. Ansonsten lagen die Proben unter Behandlung in einem Viabilitätsbereich zwischen 100% und 80%. Die MCL-Zelllinie Jeko-1 zeigte über 72 Stunden ein kontinuierliches Wachstum der unbehandelten Kontrolle und in den beiden sehr niedrigen Dosierungen von 5 nM und 50 nM. Erst in den höheren Dosierung war die zu erwartende Proliferationshemmung durch Palbociclib zu verzeichnen (siehe Abbildung 11).

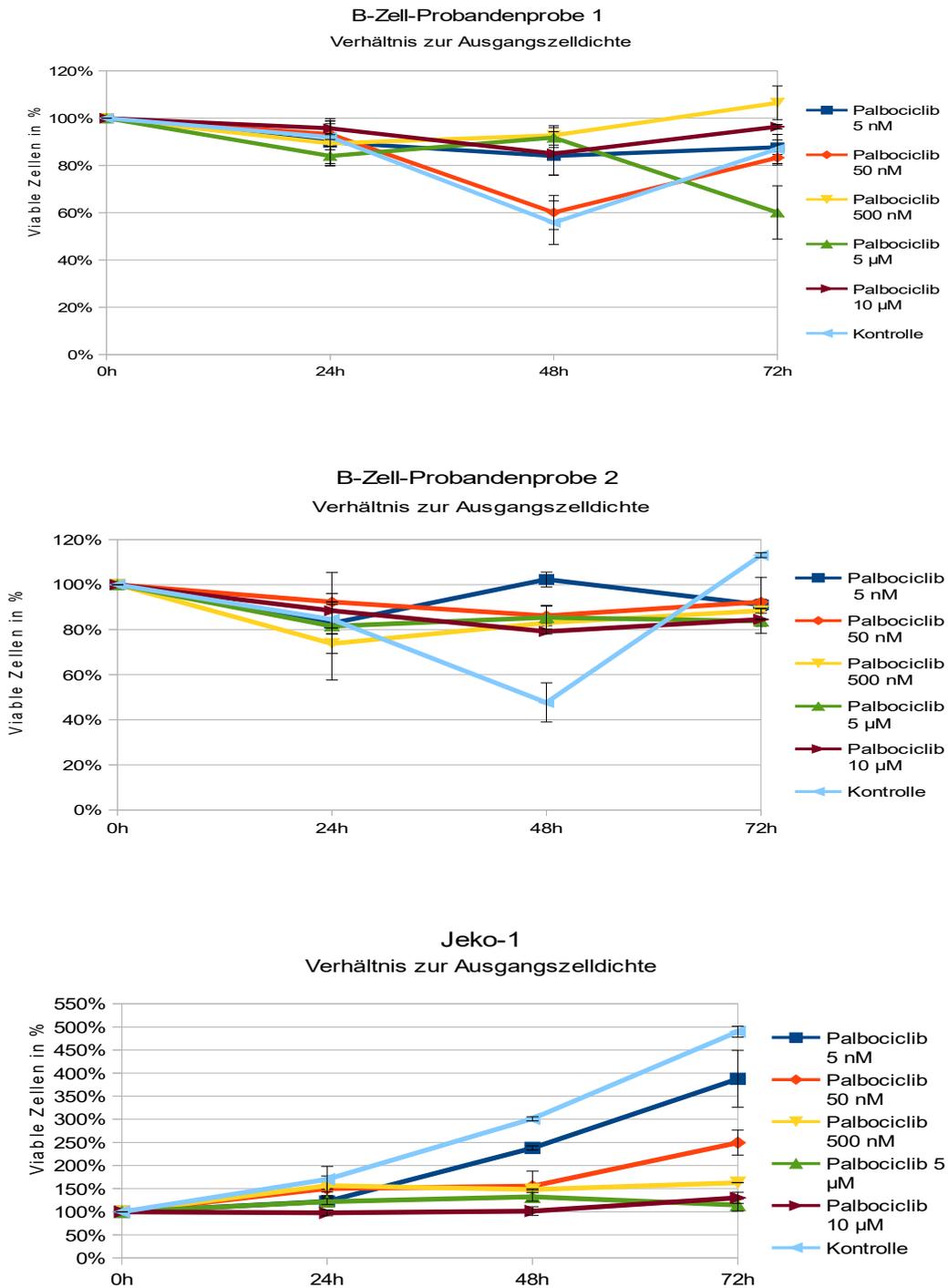


Abbildung 11: Wirkung von Palbociclib auf gesunde B-Lymphozyten

Die B-Zellen zweier gesunder Probanden wurden mit verschiedenen Konzentrationen Palbociclib inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden gezählt. Als Kontrolle diente die Mantelzell-Lymphom-Zelllinien Jeko-1. Viable Zellen im Verhältnis zur Ausgangszellichte. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten

5.2 Der BTK-Inhibitor Ibrutinib

5.2.1 Zeitabhängige Proliferationshemmung in MCL-Zelllinien

Um die Wirkung von Ibrutinib auf die Proliferation der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien zu untersuchen, wurden die drei Zelllinien Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 mit 5 μ M Ibrutinib über 72 Stunden inkubiert. Viabilität und Zellzahl wurden nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-Cell ausgewertet.

Es zeigte sich eine zeitabhängige Proliferationshemmung bei allen MCL-Zelllinien. Die stärkste Reduktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigte Jeko-1 mit 41,3% viablen Zellen nach 72 Stunden. Initial nach 24 Stunden war eine Reduktion auf 86,9% zu verzeichnen, die sich nach 48 Stunden auf 59,4% weiter senken ließ. Somit zeigte Jeko-1 einen signifikanten Sprung in der Wirkung von Ibrutinib von 24 auf 48 Stunden. Auch die Zelllinie Mino-1 sprach gut auf Ibrutinib an. Nach 24 Stunden war noch eine Viabilität von 86,6% der Zellen zu erkennen. Diese Reduktion erreichte ihren Maximalwert nach 72 Stunden mit 49,4%. Mino-1 und Jeko-1 zeigten ein ähnliches Proliferationsverhalten durch die Inhibition mit Ibrutinib. Granta 519 sprach hingegen nicht so gut auf Ibrutinib an. Hier zeigte sich erst nach 48 Stunden eine deutlichere Reduktion auf 82,9% viable Zellen. Nach 24 Stunden konnte eine minimale Proliferationshemmung von 1% mittels Ibrutinib erreicht werden. Mit 75% viable Zellen nach 72 Stunden zeigte Granta 519 auch in der Langzeitexposition ein schlechteres Ansprechen im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Zelllinien (siehe Abbildung 12).

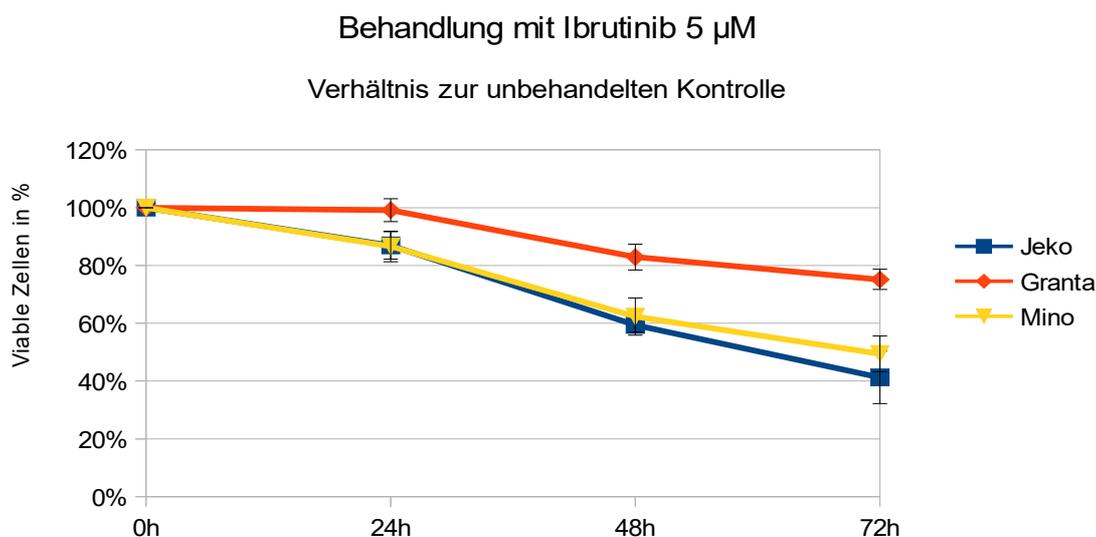


Abbildung 12: Wachstumskurven mit 5 μ M mit Ibrutinib

Die drei MCL-Zelllinien Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 wurden über 72 Stunden mit 5 μ M Ibrutinib inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-Cell ausgewertet. Gezeigt ist der prozentuale Anteil viable Zellen bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Es handelt sich um den jeweiligen Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Im Verhältnis zur Ausgangszellichte zeigte sich Ibrutinib bei Jeko-1 am potentesten (siehe Abbildung 13). Nach 24 Stunden zeigte sich kein Unterschied zwischen der Kontrolle und den mit Ibrutinib behandelten Zellen (1,5%). Erst nach 48 Stunden konnte durch Ibrutinib initial die Proliferation auf 64% im Verhältnis zur Ausgangszellichte gesenkt werden, um nach 72 Stunden auf eine Zellproliferation von 111% zu kommen. Dies macht einen signifikanten Unterschied in der Proliferationshemmung mit und ohne Ibrutinib von 374% nach 72 Stunden aus. Ibrutinib konnte so bei Jeko-1 eine deutliche Wachstumshemmung zeigen. Ähnlich verhielt sich auch die Zelllinie Mino-1, die nach 72 Stunden Expositionszeit mit Ibrutinib auf eine Reduktion von 238% im Vergleich zum Wachstum der Kontrolle kam. Im Vergleich zur Ausgangszellichte war dennoch ein deutlicher Zuwachs der Proliferation von 182% zu verzeichnen. Granta 519 hingegen zeigte sich im zeitlichen Verlauf sehr viel resistenter. Nach 24 Stunden zeigte sich kein Unterschied in den

Wachstumsraten zwischen den behandelten Zellen und der Kontrolle (4,5%). Auch nach 48 Stunden war nur eine geringe Proliferationshemmung von 38% im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Mit 134% Differenz nach 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle hat Granta 519 kaum auf Ibrutinib reagiert. Dies zeigt auch der starke Proliferationszuwachs von 302% gegenüber dem Zeitpunkt 0 in der Kontrolle.

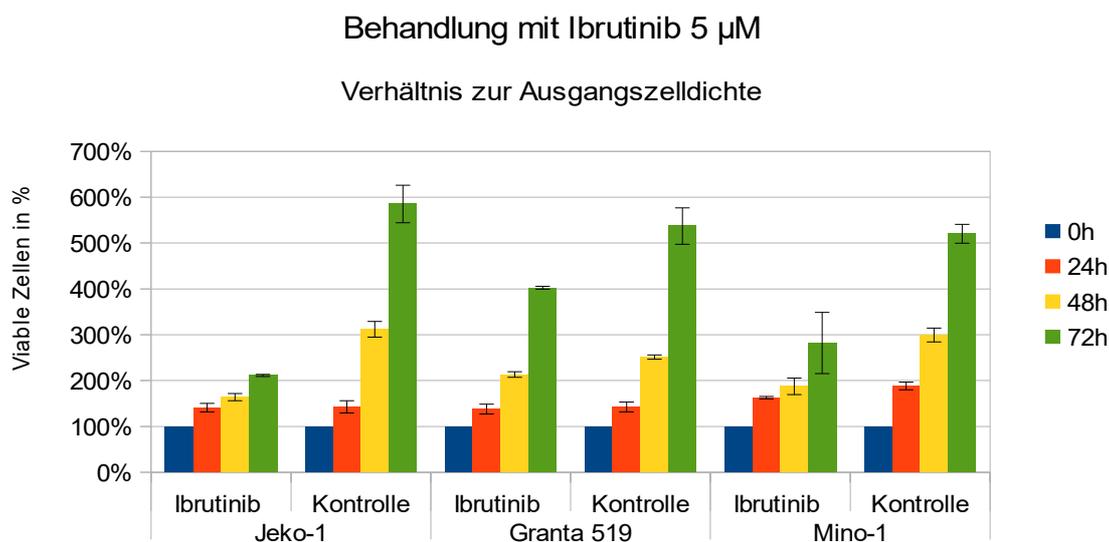


Abbildung 13: Wachstumskurven mit 5 μ M mit Ibrutinib

Die drei MCL-Zelllinien Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 wurden über 72 Stunden mit 5 μ M Ibrutinib inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-Cell ausgewertet. Gezeigt ist der prozentuale Anteil viabler Zellen bezogen auf die Ausgangszellichte. Es handelt sich um den jeweiligen Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Ibrutinib hat sich in einer Dosierung von 5 μ M als potent in der Proliferationshemmung gezeigt., wobei nicht alle MCL-Zelllinien gleich gut angesprochen haben. Granta 519 zeigte sich als resistenteste Zelllinie gegenüber Ibrutinib im zeitlichen Verlauf. Insgesamt konnte das Wachstum aller Zellen im Vergleich zur Kontrolle aber gut gehemmt werden.

5.2.2 Auswirkungen von Ibrutinib auf den Zellzyklus

Um die Wirkung von Ibrutinib auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Inhibitor Ibrutinib mit einer Dosierung von 5 μ M inkubiert und nach 24 Stunden einer durchflusszytometrischen Untersuchung zugeführt. Mittels PI-Färbung wurden je Probe 1×10^6 /ml Zellen untersucht.

Das Zellzyklusprofil zeigte bei allen drei untersuchten Zelllinien ähnliche Veränderungen, die sich allerdings nicht signifikant zeigten. So führte die Exposition von Ibrutinib zu einem leichten Anstieg der G1-Phase, bei gleichzeitig leichter Abnahme der S-Phase. Granta 519 zeigte hier die stärkste Verschiebung mit einer Zunahme der G1-Phase von 46,2% im Vergleich zu 30,9% bei der unbehandelten Kontrolle. Die S-Phase hingegen nahm unter der Behandlung mit Ibrutinib um 10,3% auf 36,7% ab. Mit einem Unterschied von etwa 5% blieb die G2-Phase eher unberührt. Mino-1 und Jeko-1 zeigten hier eine ähnliche Änderung des Zellzyklusprofils. In beiden Zellen nahm die G1-Phase im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen um etwa 10% zu. Die G2-Phase blieb auch hier fast unverändert. Die S-Phase verschob sich entsprechend der Zunahme der G1-Phase. Bei Mino-1 nahm sie um 12,9% auf 38,9% ab. Ebenso bei Jeko-1, wobei sich die S-Phasen-Abnahme ähnlich zeigte wie die Zunahme der G1-Phase. Die Abnahme der S-Phase unter Behandlung mit Ibrutinib zeigte bei Jeko-1 einen Wert von 8,7%. Somit zeigte Granta 519 hier die stärkste Verschiebung im Zellzyklusprofil, die allerdings hinter der Verschiebung mit Palbociclib zurückblieb. Zusammenfassend hat Ibrutinib nur einen geringen Einfluss auf den Zellzyklus gezeigt und keine stärkeren Verschiebungen des Zellzyklus induziert. (siehe Abbildung 14).

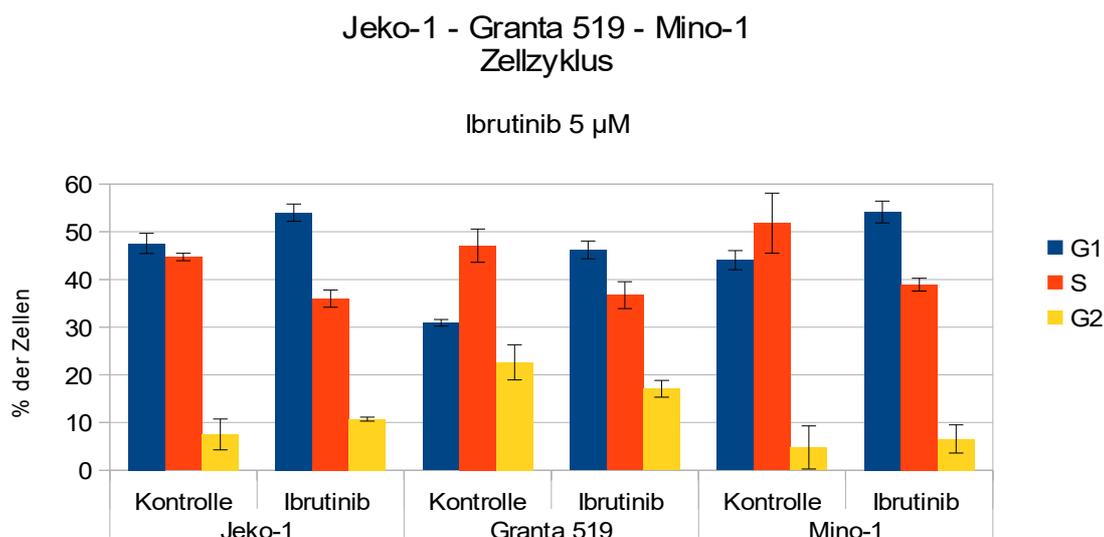


Abbildung 14: Zellzyklusanalyse mittels PI

Nach 24 Stunden Inkubationszeit mit 5 μ M Ibrutinib wurden die MCL-Zelllinien hinsichtlich ihres Zellzyklusprofils durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 aus jeweils drei Mittelwerten und Standardabweichungen, erstellt aus drei unabhängigen Experimenten.

5.2.3 Apoptoseinduktion durch Ibrutinib

Die drei Mantelzell-Lymphom-Zelllinien wurden ebenfalls daraufhin untersucht, ob durch Ibrutinib eine Apoptose induziert wird. Die Zellen wurden hierzu mit einer Dosis von 5 μ M Ibrutinib inkubiert und nach 24 Stunden mittels Annexin V-PE und 7-AAD gefärbt und hierauf durchflusszytometrisch untersucht.

Alle drei Zelllinien zeigten keine Apoptose durch Ibrutinib. Nach 24 Stunden zeigte Jeko-1 einen Anteil an viablen Zellen von 92,3%. Die Viabilität hat sich hier nicht von der unbehandelten Kontrolle unterschieden, die eine Viabilität von 92,6% zeigte. Granta 519 zeigte schon in der unbehandelten Kontrolle einen frühapoptotischen Anteil von 12,8%. Dieser frühapoptotische Anteil hat unter der Behandlung auf 12,3% abgenommen, allerdings liegt bei dieser Probe die Standardabweichung bei 8,6%. Dafür wurde durch die Behandlung mit Ibrutinib gleichwohl die Viabilität leicht verschoben, so dass die Viabilität unter der Behandlung bei 67% lag, im Vergleich zur Kontrolle die

71,7% viable Zellen zeigte. Auch Mino-1 hat lediglich eine Verschiebung von 1,4% in der Viabilität unter Behandlung gezeigt. Somit konnte bei allen untersuchten Zelllinien keine Apoptoseinduktion durch Ibrutinib nachgewiesen werden (siehe Abbildung 15).

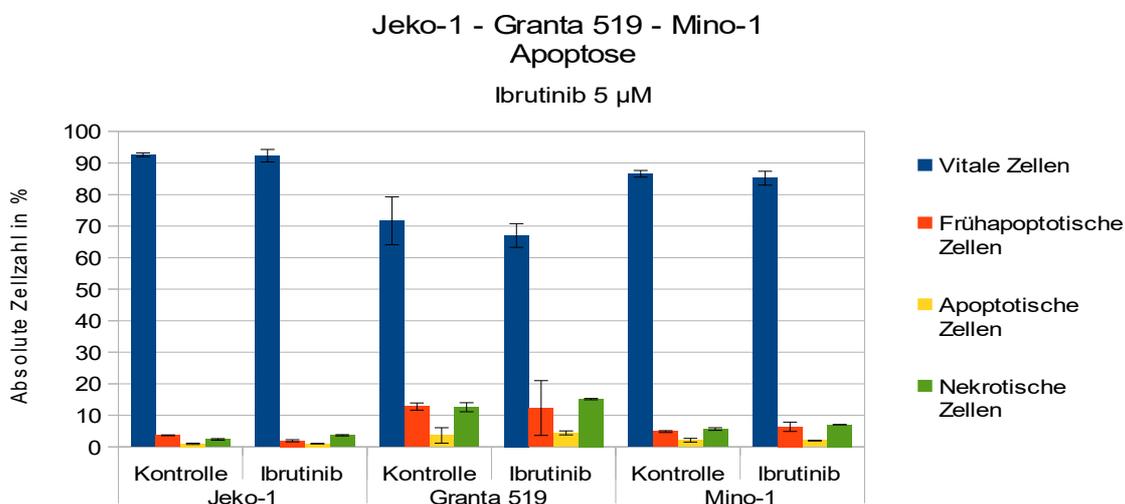


Abbildung 15: Apoptoseverhalten mit 5 μ M Ibrutinib

Mittels Annexin V-PE und 7-AAD wurde die Wirkung von 5 μ M Ibrutinib hinsichtlich einer Apoptoseinduktion auf die MCL-Zelllinien nach 24 Stunden Inkubation untersucht. Gezeigt ist die absolute Zellzahl jeweils der Kontrolle und der behandelten Zelllinie. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus drei unabhängigen Experimenten erhoben.

5.3 Der PI3K-Inhibitor Idelalisib

5.3.1 Zeitabhängige Proliferationshemmung in MCL-Zelllinien

Die Untersuchung der Wirkung von Idelalisib auf die Mantelzell-Lymphom-Zelllinien war ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Um die Wirkung von Idelalisib auf die Proliferation der drei MCL-Zelllinien Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 zu untersuchen, wurden diese mit dem PI3K-Inhibitor in einer Dosierung von 5 μ M inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-Cell-Analyse untersucht.

Die drei MCL-Zelllinien zeigten hierbei ähnliche Ergebnisse in der Proliferationshemmung mittels Idelalisib. Allerdings hat sich erst nach 72 Stunden eine ähnliche maximale Reduktion der Zellviabilität gezeigt. Granta 519 hatte nach 72 Stunden eine Reduktion auf 79,7% an viablen Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gezeigt. Nach 24 und 48 Stunde war lediglich eine Wirkung der Reduktion von 92,9% und 93,8% viabler Zellen bei Granta 519 zu sehen. Dies zeigt, dass die Zelllinie Granta 519 sich initial relativ resistent auf Idelalisib gezeigt hat und erst im Verlauf eine gewisse Sensitivität entwickelt hat. Jeko-1 hingegen zeigte schon nach 24 Stunden eine Reduktion auf 85,2% an viablen Zellen. Seine maximale Reduktion erreichte Jeko-1 nach 72 Stunden mit einer Viabilität von 61,9%. Jeko-1 hat von den drei untersuchten Zelllinien am sensibelsten auf den PI3K-Inhibitor reagiert. Auch Mino-1 zeigte initial eine Reduktion um 16,5% auf 83,5% viable Zellen. Die maximale Reduktion war allerdings schon nach 48 Stunden zu verzeichnen. Mit 71,9% viabler Zellen nach 48 Stunden, stieg die Viabilität nach 72 Stunden wieder auf 77,3% an. Somit zeigte Mino-1 schon nach 48 Stunden einen Effekt der Proliferationshemmung, der allerdings nicht anhielt (siehe Abbildung 16).

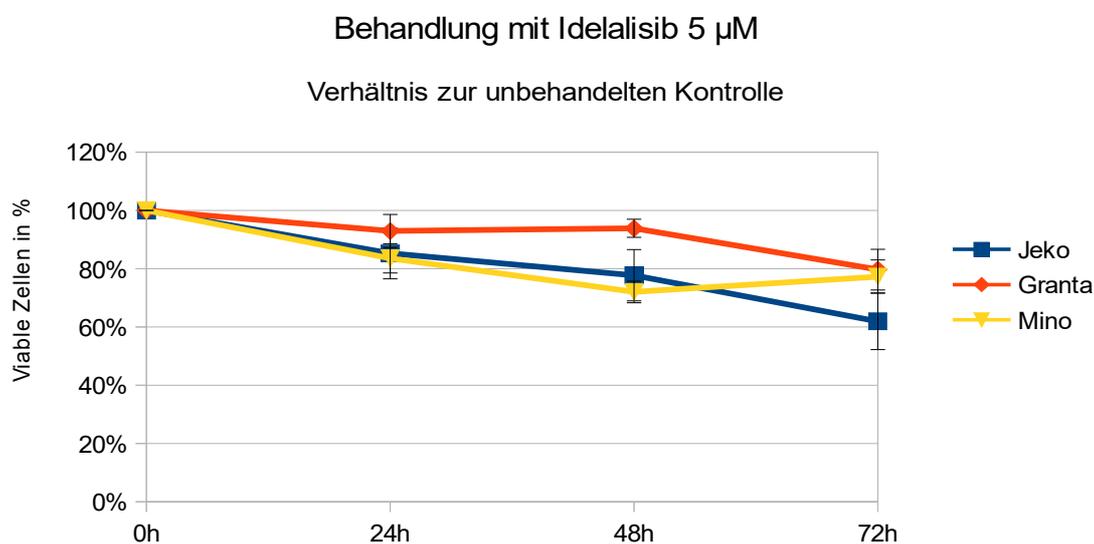


Abbildung 16: Wachstumskurven mit 5 μ M Idelalisib

Dargestellt ist der prozentuale Anteil viabler Zellen bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 wurden mit 5 μ M Ibrutinib für 72 Stunden inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-Cell gezählt. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus drei unabhängigen Experimenten erhoben.

Im Vergleich zur Ausgangszelldichte (siehe Abbildung 17) zeigte sich Jeko-1 sehr sensibel auf die Behandlung mit 5 μ M Idelalisib. Hier zeigte sich nach 24 Stunden eine Proliferation von 34%. Jeko-1 zeigte unter der Behandlung eine stetig steigende Proliferation bis auf 246% nach 72 Stunden. Vergleicht man die unbehandelte Kontrolle zu diesem Zeitpunkt mit einer Proliferationsrate von 485% zeigte sich eine signifikante Hemmung durch Idelalisib mit einer Differenz von 239%. Granta 519 hat hier im Vergleich zur Ausgangszelldichte einen Proliferationszuwachs unter Behandlung mit Idelalisib von 306% nach 72 Stunden gezeigt. Mit einer Differenz von lediglich 131% im Vergleich zur Proliferation der unbehandelten Kontrolle mit 437% hat Idelalisib hier nur eine geringe Wirkung gezeigt. Mino-1 zeigte im gesamten zeitlichen Verlauf über 72 Stunden eine starke Proliferation unabhängig von Idelalisib. Nach 48 Stunden zeigte sich im Vergleich zur Ausgangszelldichte sowohl mit Idelalisib als auch in der unbehandelten Kontrolle ein Proliferationszuwachs von 199%. Nach weiteren 24 Stunden stieg die Proliferation auf insgesamt 386% unter Behandlung mit Idelalisib an, so dass sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nur eine minimale Wachstumsdifferenz von 34% gezeigt hat.

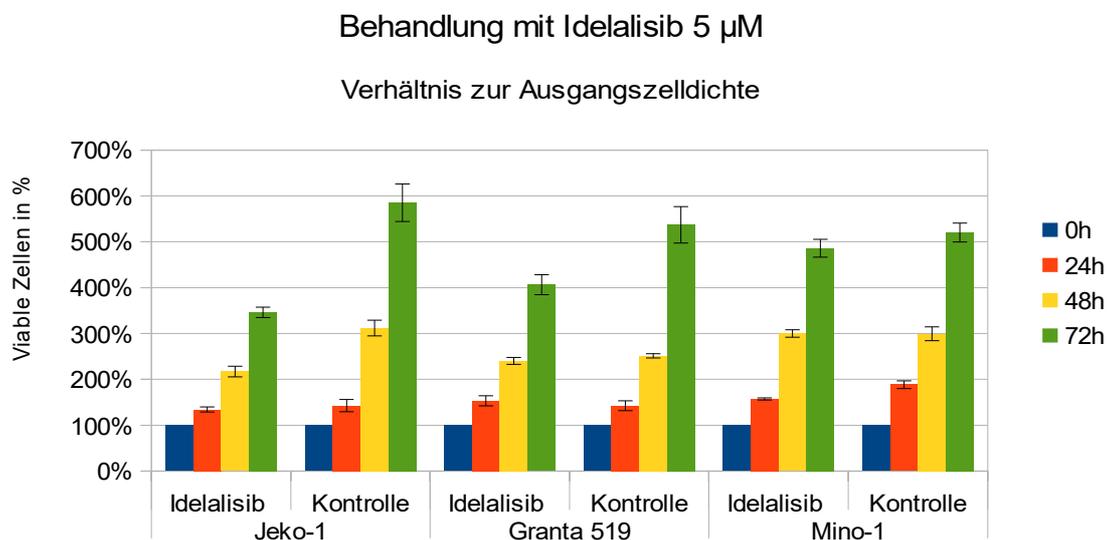


Abbildung 17: Wachstumskurven mit 5 μ M Idelalisib

Dargestellt ist der prozentuale Anteil viabler Zellen bezogen auf die Ausgangszelldichte. Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 wurden mit 5 μ M Ibrutinib für 72 Stunden inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-Cell gezählt. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus drei unabhängigen Experimenten erhoben.

Die drei untersuchten Zelllinien Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 haben sehr unterschiedlich auf Idelalisib 5 μM angesprochen. Während Jeko-1 sich als sensibelste Zelllinie zeigte, erwiesen sich Granta 519 und Mino-1 als relativ resistent. Die Zellproliferation wurde – abhängig von der jeweiligen Zelllinie – in einem eher geringeren Maße beeinflusst.

5.3.2 Auswirkungen von Idelalisib auf den Zellzyklus

Auch die Wirkung von Idelalisib auf den Zellzyklus wurde bei den drei MCL-Zelllinien untersucht. Die Zellen wurden ebenfalls mit Idelalisib mit einer Dosis von 5 μM für 24 Stunden inkubiert und mittels PI-Färbung im Durchflusszytometer ausgewertet.

Granta 519 und Mino-1 zeigten unter der Behandlung mit Idelalisib eine nennenswerte Verschiebung des Zellzyklusprofils. Mino-1 zeigte hier eine Abnahme der S-Phase von 51,8% in der unbehandelten Kontrolle auf 38,5% durch den Inhibitor. Hierbei zeigte sich sowohl eine Zunahme der G1-Phase (7,8%) und der G2-Phase (5,7%). Gleichwohl blieb auch hier Idelalisib hinter der Wirkung von Palbociclib mit einem Maximum der G1-Phase von nur 51,8% zurück. Auch Granta 519 zeigte eine Verschiebung der G2-Phase um 5,5%. Hierbei nahm durch die Behandlung mit Idelalisib die G2-Phase allerdings ab. Die G1-Phase verschob sich auf 46,2% von 30,9% in der unbehandelten Kontrolle. Die S-Phase hat sich dementsprechend unter der Behandlung mit Idelalisib verringert. Jeko-1 zeigte keine Verschiebung der G2-Phase und nur eine leichte Veränderung der G1/S-Phase von etwa 5%. Idelalisib in einer Dosierung von 5 μM hat ebenfalls nur einen geringen Effekt auf den Zellzyklus gezeigt (siehe Abbildung 18).

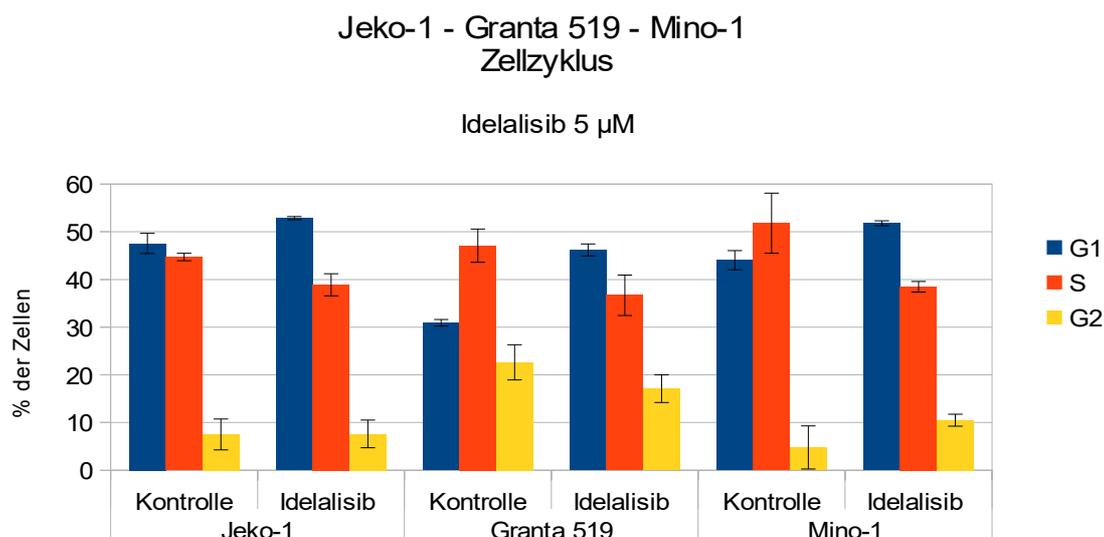


Abbildung 18: Zellzyklusanalyse mit 5 μ M Idelalisib

Nach 24 Stunde Inkubationszeit mit 5 μ M wurden die drei MCL-Zelllinien mittels PI Färbung hinsichtlich ihres Zellzyklusprofils untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

5.3.3 Apoptoseinduktion durch Idelalisib

Die Wirkung von Idelalisib hinsichtlich des Potentials eine Apoptose zu induzieren wurde ebenfalls untersucht. Die MCL-Zelllinien Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 wurden hierzu nach 24 Stunden Inkubationzeit mit 5 μ M Idelalisib mit Annexin V-PE und 7-AAD gefärbt und mittels Durchflusszytometer untersucht.

Auch mit Idelalisib zeigten die untersuchten Zelllinien kaum eine Abnahme der Viabilität. Lediglich Granta 519 brachte einen leichten Zuwachs an apoptotischen Zellen durch Idelalisib. Granta 519 zeigte auch hier schon in der unbehandelten Kontrolle einen frühapoptotischen Teil von 29,2%. Durch die 24 stündige Inkubation mit Idelalisib blieb dieser Anteil allerdings nahezu unverändert bei 27,3%. Die Viabilität nahm um 10% ab. Der Anteil an apoptotischen Zellen erhöhte sich entsprechend von 8,3% in der unbehandelten Kontrolle auf 18,7% durch Idelalisib. Mino-1 und Jeko-1 hingegen zeigten keine Wirkung hinsichtlich einer Apoptose auf Idelalisib.

Die Viabilität von Jeko-1 änderte sich kaum (92,1% unbehandelt gegenüber 89,7% behandelt). Ebenfalls konnte Idelalisib auch in Mino-1 keine Apoptose auslösen. Die Viabilität ist in der behandelten Zelllinie sogar leicht um 1,7% gestiegen (86,5% unbehandelt und 88,2% behandelt). Somit hat Idelalisib in keiner der untersuchten Zelllinien eine Apoptose auslösen können (siehe Abbildung 19).

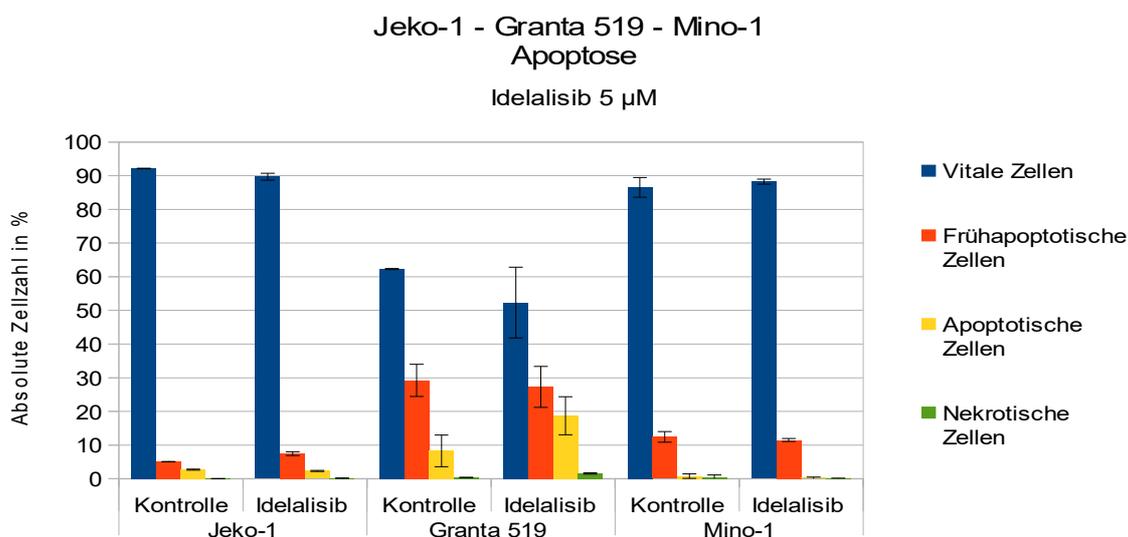


Abbildung 19: Apoptoseinduktion mit 5 μ M Idelalisib

Die drei MCL-Zelllinien Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 wurden mit 5 μ M Idelalisib für 24 Stunden inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch hinsichtlich ihres Apoptoseverhaltens untersucht. Gezeigt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

5.4 Kombination von Palbociclib und Ibrutinib

5.4.1 Zeitabhängige Proliferationshemmung

In der ersten Kombinationsanalyse wurde 62,5 nM Palbociclib zusammen mit dem BTK-Inhibitor Ibrutinib 5 μ M mit den drei Zelllinien Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 über 72 Stunden angesetzt. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen mittels Vi-Cell gezählt.

Die drei Zelllinien haben insgesamt gut auf die Kombinationstherapie angesprochen und es konnte eine deutliche Abnahme der Zellzahl über Zeit erzielt werden (siehe Abbildung 20). Jeko-1 hat schon nach 24 Stunden eine Abnahme der Zellviabilität von 22,1% gezeigt. Nach 72 Stunden war eine relativ starke Reduktion auf nur noch 18,9% an viablen Zellen zu verzeichnen. Mino-1 und Granta 519 haben initial nach 24 Stunden ähnlich gut auf die Kombinationstherapie angesprochen. Hier waren in beiden Zelllinien noch etwa 85% der Zellen viabel. Mino-1 zeigte hier eine stärkere Reduktion im zeitlichen Verlauf. Nach weiteren 24 Stunden sank die Zellzahl weiter auf 48%, um eine maximale Zellzahlreduktion nach 72 Stunden von 29,2% aufzuweisen. Granta 519 hat nach 72 Stunden nur noch eine viable Zellzahl von 38,8% und sich somit resistenter gezeigt. Zwischen 48 Stunden und 72 Stunden konnte nur noch eine Reduktion von 12,7% erreicht werden.

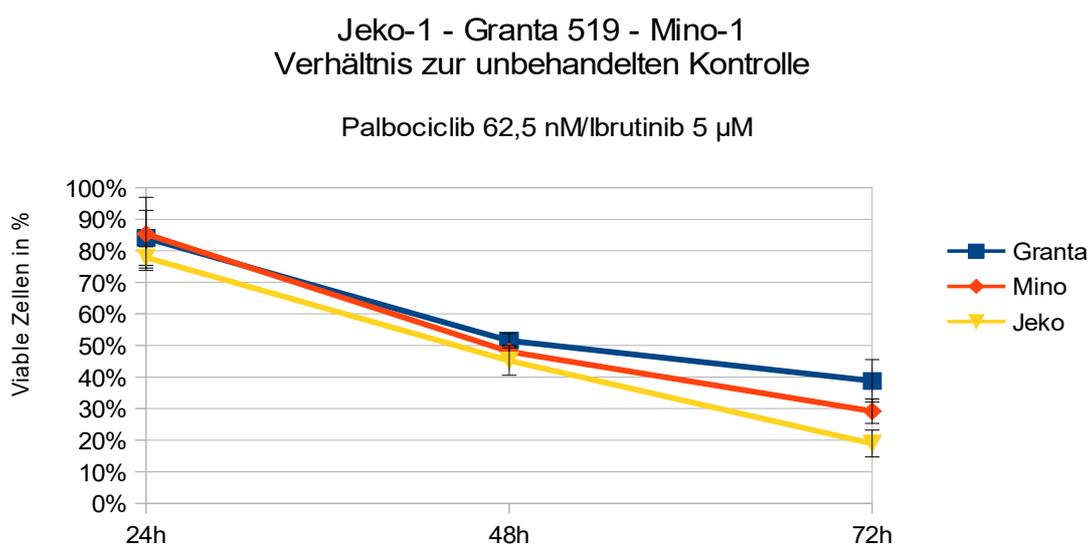


Abbildung 20: Kombination von Palbociclib und Ibrutinib

Die Mantelzell-Lymphom-Zellen Jeko-1, Mino-1 und Granta 519 wurden mit 62,5 nM Palbociclib und 5 μ M Ibrutinib über 72 Stunden inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-Cell gezählt. Dargestellt sind die viablen Zellen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten

Alle drei Zelllinien haben im zeitlichen Verlauf sehr gut auf die Kombination von Palbociclib und Ibrutinib angesprochen. Auch hier hat sich Jeko-1 als sensibelste

Zelllinie gezeigt. Über die ganzen 72 Stunden betrachtet, sind die Zellen mit 8% - 9% kaum proliferiert. Granta 519 hat nach 48 Stunden einen Zuwachs von 29% gezeigt. Allerdings hat die Resistenz nach 72 Stunden zugenommen, da die Zellproliferation um 60% auf 89% im Verhältnis zur Ausgangszelldichte angestiegen ist. Mino-1 hat sich initial nach 24 Stunden und einer Proliferation von 68% als eher resistent gezeigt. Im Verlauf konnte die Proliferation wieder gehemmt werden (42% nach 48 Stunden), ist jedoch nach 72 Stunden wiederum auf 84% angestiegen.

Jeko-1 hat somit in der Kombinationstherapie eine signifikante Proliferationshemmung nach 72 Stunden gegenüber der unbehandelten Kontrolle von 476% gezeigt. Granta 519 und Mino-1 haben hier zum selben Zeitpunkt nur eine Differenz von 348% bzw. 336% gezeigt (siehe Abbildung 21).

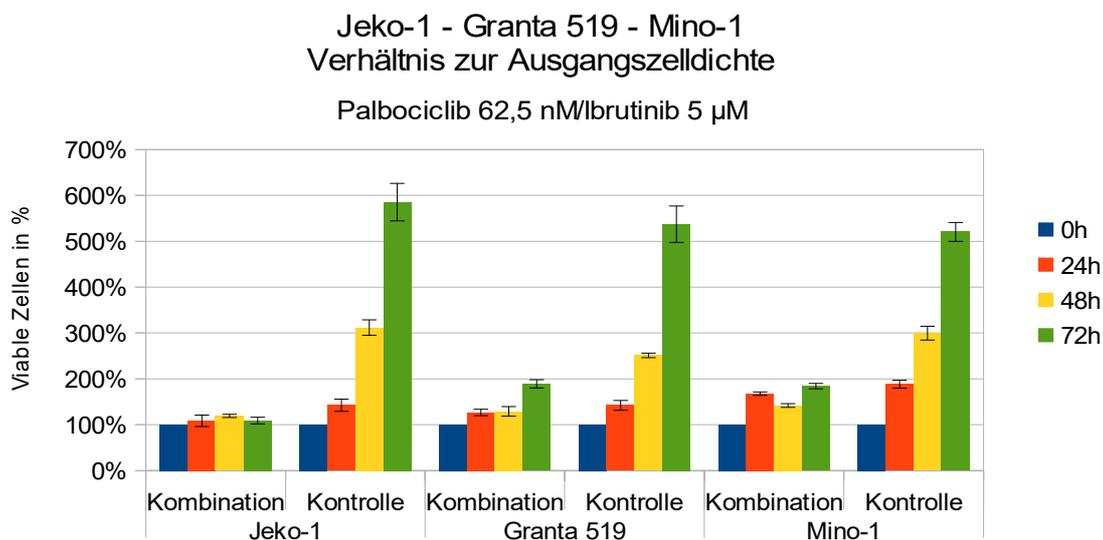


Abbildung 21: Kombination von Palbociclib und Ibrutinib

Die Mantelzell-Lymphom-Zellen Jeko-1, Mino-1 und Granta 519 wurden mit 62,5 nM Palbociclib und 5 µM Ibrutinib über 72 Stunden inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-Cell gezählt. Dargestellt sind die viablen Zellen im Verhältnis zur Ausgangszelldichte. Gezeigt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten

Die Kombination von Palbociclib mit Ibrutinib hat sich als gut wirksam erwiesen und die Zellproliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant senken können.

In den beiden nachfolgenden Grafiken wurden die Werte von Palbociclib, Ibrutinib und der Kombination nach 72 Stunden Expositionszeit zur besseren Übersicht gegenüber gestellt. Abbildung 22 zeigt das Wachstum im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle, Abbildung 23 im Verhältnis zur Ausgangszellichte.

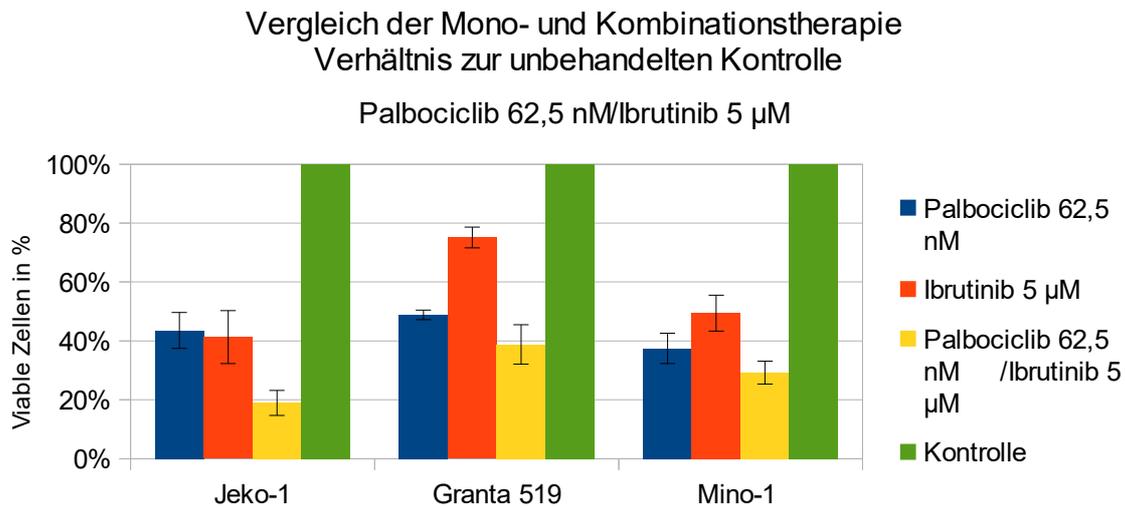


Abbildung 22: Vergleich der Zellviabilität von Palbociclib in Mono- und in Kombinationstherapie mit Ibrutinib im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle

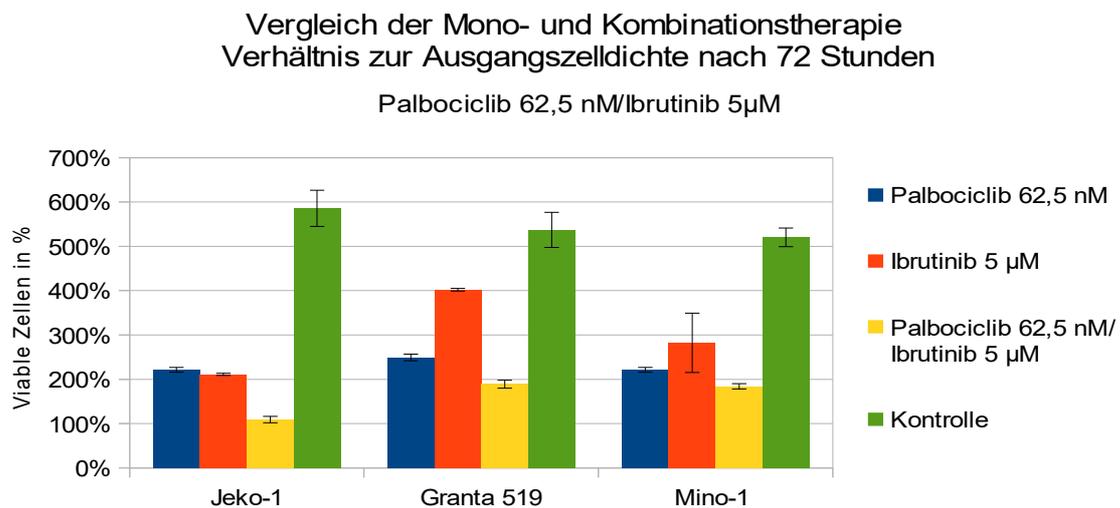


Abbildung 23: Vergleich der Zellviabilität von Palbociclib in Mono- und in Kombinationstherapie mit Ibrutinib im Verhältnis zur Ausgangszellichte

Fraction of Product

Die Ergebnisse des Fraction of Product der Kombination von Palbociclib und Ibrutinib zeigten bei allen Zelllinien von Anfang an Werte, die kleiner als $-0,1$ waren (siehe Abbildung 24). Dieser antagonistische Effekt hat bei allen drei Zelllinien über die Zeit zugenommen und ist bei Granta 519 am stärksten ausgefallen. Bei Mino-1 war der antagonistische Effekt initial nicht so stark ausgeprägt, zeigte aber nach 48 Stunden einen ausgeprägteren Antagonismus.

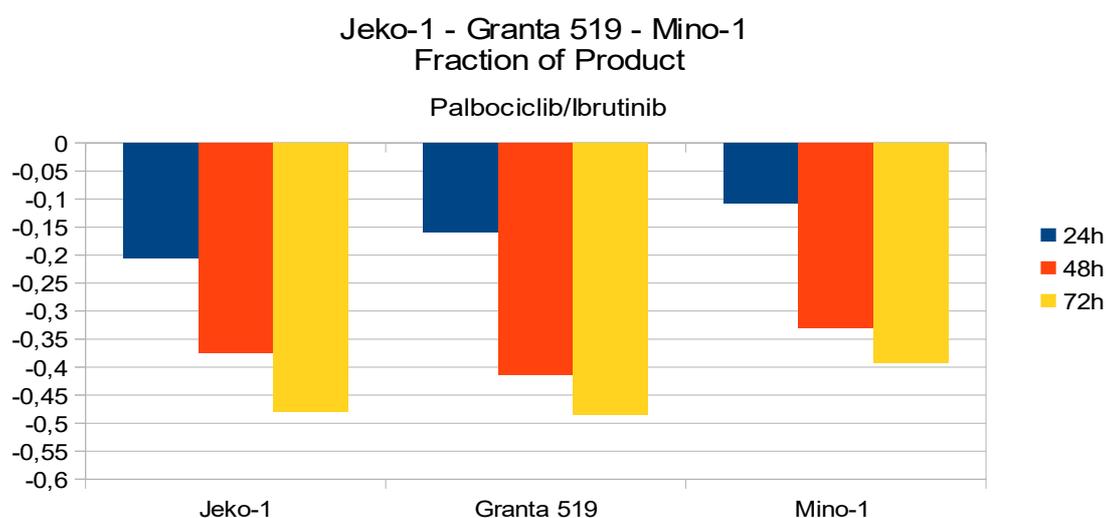


Abbildung 24: Fraction of Product der Kombination Palbociclib und Ibrutinib

Gezeigt ist das Fraction of Product der drei MCL-Zelllinien Jeko-1, Mino-1 und Granta 519, jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden. Inkubationszeit mit $62,5$ nM Palbociclib und 5 μ M Ibrutinib. Werte über $0,1$ zeigen einen Synergismus an, Werte unter $-0,1$ einen Antagonismus. Werte dazwischen zeigen einen additiven Effekt an.

5.4.2 Auswirkungen der Kombinationstherapie auf den Zellzyklus

Um eine etwaige verstärkte Zellzyklusverschiebung in der Kombination von Palbociclib und Ibrutinib zu untersuchen, wurden die drei Zelllinien Mino-1, Jeko-1 und Granta 519 nach 24 Stunden Inkubation mit $62,5$ nM Palbociclib und 5 μ M Ibrutinib durchflusszytometrisch untersucht.

Die Kombinationstherapie hat zu einer Zellzyklusverschiebung geführt, die in einem Zugewinn der G1-Phase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle resultierte. Jeko-1 hat in der unbehandelten Kontrolle einen prozentualen Anteil der G1-Phase von 47,5%. Durch die Kombinationstherapie ist der Anteil der G1-Phase um 24,6% auf 72,1% angestiegen. Die S-Phase hingegen hat hier signifikant um über 30% abgenommen. Zusätzlich konnte auch eine Verschiebung der G2-Phase erkannt werden. Die G2-Phase hat unter Behandlung einen Anteil von 13,9% erreicht, bei initial 7,5%. Interessanterweise hat diese Zunahme der G2-Phase nur die Zelllinie Jeko-1 gezeigt. Die anderen beiden untersuchten Zelllinien haben jeweils mit einer Senkung des G2-Anteils auf die Behandlung reagiert. Mino-1 hat einen signifikanten Zugewinn der G1-Phase von 44% in der unbehandelten Kontrolle auf 91,9% unter der Behandlung erreicht. Dies hat wiederum zu einer massiven Reduktion der S-Phase um 46,1% auf nur noch 5,6% geführt. Die G2-Phase blieb dabei fast unberührt (Reduktion um 2,3%). Eine ähnliche Entwicklung hat auch Granta 519 gezeigt. Mit einer Zunahme von 28,8% auf 59,7% Anteil der G1-Phase konnte Granta 519 auch hier eine starke Verschiebung des Zellzyklusprofils zeigen. Dementsprechend hat auch hier die S-Phase auf 21,8% abgenommen. Die G2-Phase, die initial schon einen relativ hohen Anteil von 22,6% hatte, ist leicht abgesunken (18,5% unter Behandlung). Somit konnte auch durch die Kombinationstherapie von Palbociclib und Ibrutinib ein starker G1-Arrest induziert werden (siehe Abbildung 25).

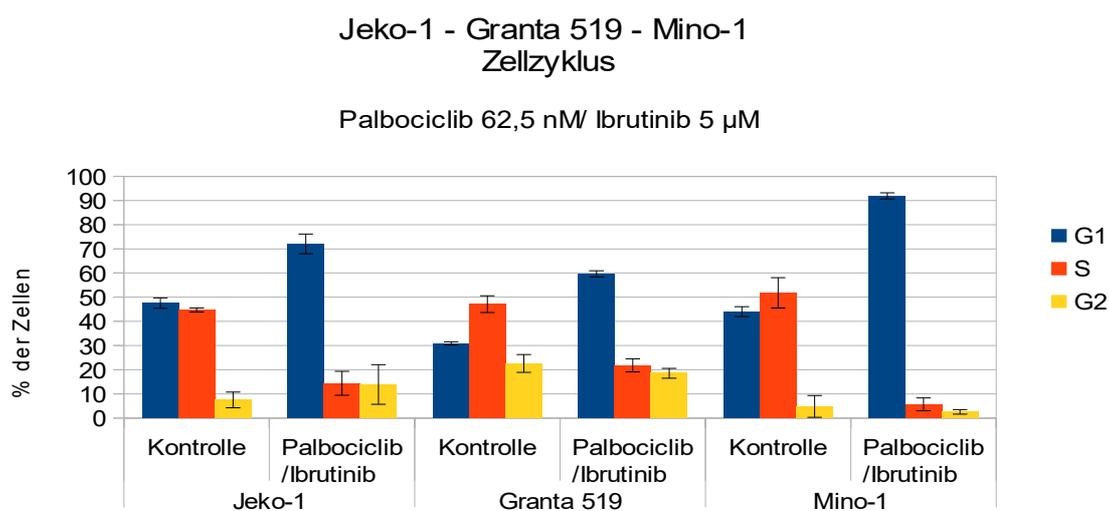


Abbildung 25: Zellzyklusanalyse mittels PI Färbung

Die drei Mantelzell-Lymphom-Zelllinien Jeko-1, Mino-1 und Granta 519 wurden mittels Palbociclib 62,5 nM und Ibrutinib 5 μ M behandelt und nach 24 Stunden durchflusszytometrisch untersucht. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten

5.4.3 Apoptoseinduktion durch die Kombinationstherapie

Auch die Kombination von Palbociclib 62,5 nM und Ibrutinib 5 μ M wurde daraufhin untersucht, ob die kombinierte Gabe beider Substanzen eine Zunahme der Apoptose bedingt. Entsprechend wurde auch hier ein standardisiertes Apoptoseassay durchgeführt. Die Kombinationstherapie hat keine Zunahme der Apoptose gezeigt. Alle drei untersuchten Zelllinien zeigten eine kaum veränderte Viabilität. Jeko-1 hat unter der dualen Behandlung mit Palbociclib und Ibrutinib eine Reduzierung der viablen Zellen von 92,6% auf 90,9% gezeigt. Dadurch ist der Anteil an frühapoptotischen Zellen leicht von 3,7% auf 4,3% unter Behandlung angestiegen. Sowohl Mino-1 als auch Granta 519 haben keinerlei Verschiebung gezeigt. Die Viabilität ist bei beiden Zelllinien annähernd gleich geblieben (71,7% behandelt gegenüber 72,2% unbehandelt bei Granta 519 und 88,8% behandelt gegenüber 86,5% unbehandelt bei Mino-1).

Somit konnte durch die Kombination von Palbociclib und Ibrutinib kein Zuwachs in der Apoptoserate erreicht werden (siehe Abbildung 26).

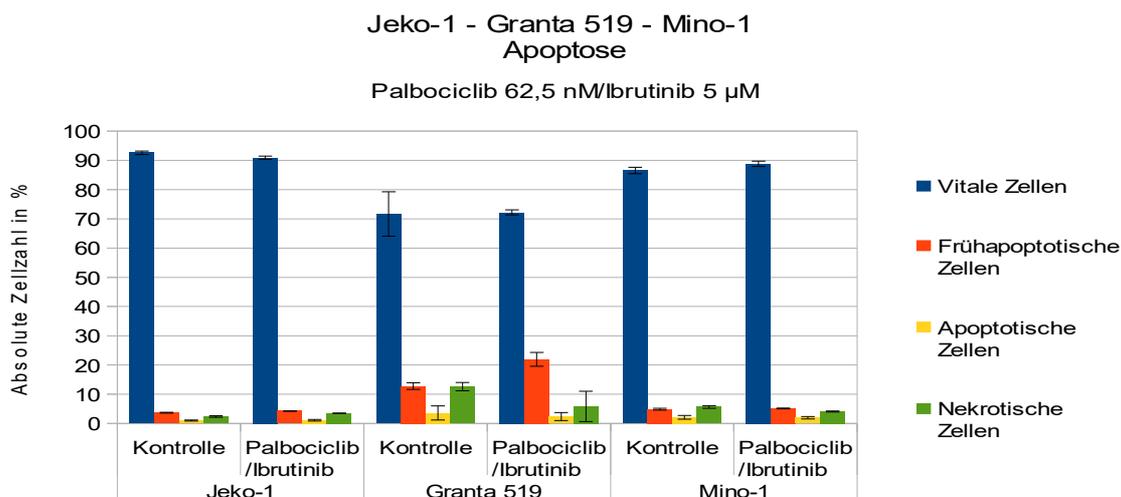


Abbildung 26: Apoptoseinduktion der Kombinationstherapie

Die drei Mantelzell-Lymphom-Zelllinien Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 wurden für 24 Stunden mit 62,5 nM und 5 μ M Ibrutinib inkubiert und mittels Annexin V-PE und 7-AAD Färbung hinsichtlich ihres Apoptoseverhaltens ausgewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

5.5 Kombination von Palbociclib und Idelalisib

5.5.1 Zeitabhängige Proliferationshemmung

Die entsprechend ihres Ansprechens auf Palbociclib ausgewählten Zelllinien Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 wurden mit 62,5 nM Palbociclib zusammen mit dem PI3K-Inhibitor Idelalisib über 72 Stunden inkubiert.

Die Kombinationstherapie mit Idelalisib hat teils ähnliche Ergebnisse gezeigt wie Palbociclib in Kombination mit Ibrutinib. Allerdings hat Granta 519 in der Proliferationshemmung nicht so stark angesprochen. Nach 24 Stunden waren initial noch 83,4% Zellen viabel. Allerdings konnte nach 72 Stunden noch ein Zuwachs der Zellzahlreduktion auf 41,4% viable Zellen erzielt werden. Es kam so zu einer deutlichen Reduktion von 43,4% zwischen 24 und 72 Stunden. Interessanterweise hat Mino-1 hier initial nach 24 Stunden nur eine Abnahme der Zellzahl von 4,5% gezeigt. Nach weiteren

24 Stunden war die Abnahme recht signifikant, so dass bei der Zählung nach 48 Stunden eine Zellviabilität von 47% erreicht wurde. Dies entspricht einer Abnahme von 48,5% und zeigt in der Zeitspanne von 24 auf 48 Stunden die stärkste Reduktion von allen untersuchten Zelllinien. Nach 72 Stunden wurde die zweitniedrigste Reduktion auf 38,7% viable Zellen erreicht. Jeko-1 hingegen hat initial, ähnlich wie Granta 519, mäßig angesprochen mit einer Zellviabilität von 86,1%. Mit einer Zahl an viablen Zellen von 28,5% nach 72 Stunden hat Jeko-1 hier die stärkste Langzeitinhibition gezeigt (siehe Abbildung 27).

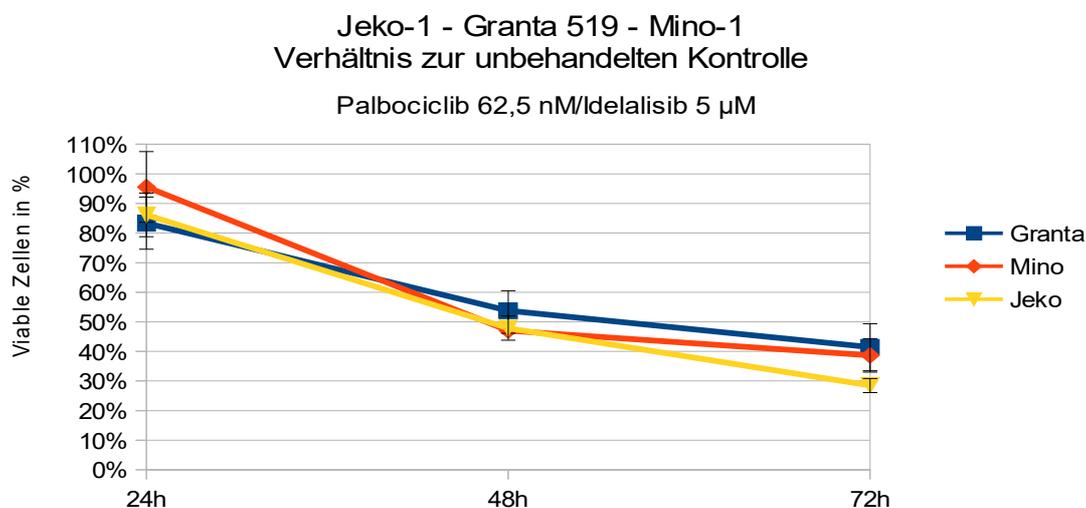


Abbildung 27: Kombination von Palbociclib und Idelalisib

Die Mantelzell-Lymphom-Zellen Jeko-1, Mino-1 und Granta 519 wurden mit 62,5 nM Palbociclib und 5 µM Idelalisib über 72 Stunden inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden gezählt. Dargestellt sind die viablen Zellen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. Gezeigt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten

Am sensibelsten hat die MCL-Zelllinie Jeko-1 reagiert. Betrachtet man die Abbildung 28 wird deutlich, dass das Wachstum nach 72 Stunden auf lediglich 70% im Verhältnis zur Ausgangszelldichte angestiegen ist. Die unbehandelte Kontrolle zeigte eine ungehemmte Proliferation von 485% zum selben Zeitpunkt. Bei Granta 519 und Mino-1 konnte über die ersten 48 Stunden eine gute Proliferationshemmung erreicht werden (45% und 42%). Nach weiteren 24 Stunden hat die Wirkung der Therapie allerdings leicht nachgelassen, so dass das Zellwachstum wieder zunehmen konnte und bei Werten

von 98% bei Granta 519 und 131% bei Mino-1 im Vergleich zum Zeitpunkt 0 lag. Dennoch zeigte sich die Proliferationshemmung auch hier signifikant, da die Kontrolle nach 72 Stunden eine fast viermal so starke Proliferation zeigte (Unbehandelte Kontrolle Granta 519: 437%, Mino-1: 420%).

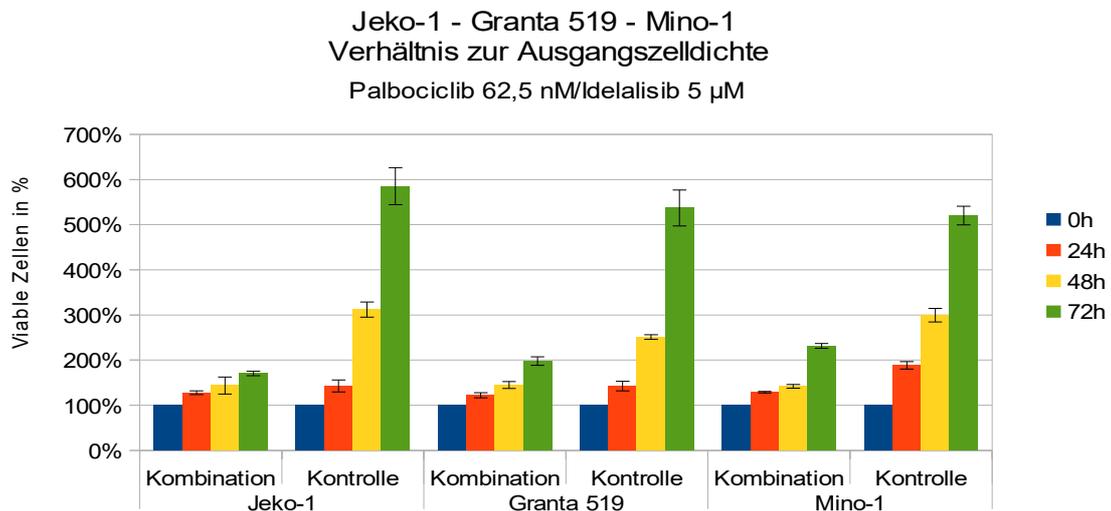


Abbildung 28: Kombination von Palbociclib und Idelalisib

Die Mantelzell-Lymphom-Zellen Jeko-1, Mino-1 und Granta 519 wurden mit 62,5 nM Palbociclib und 5 µM Idelalisib über 72 Stunden inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden gezählt. Dargestellt sind die viablen Zellen im Verhältnis zur Ausgangszelldichte. Gezeigt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten

Die Kombination von Palbociclib mit Idelalisib zeigte eine gute Wirkung in der Proliferationshemmung bei den untersuchten MCL-Zelllinien. Die Zellviabilität konnte initial und auch im zeitlichen Verlauf signifikant reduziert werden.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die einzelnen Werte von Palbociclib, Idelalisib und der Kombination in den beiden folgenden Grafiken nach 72 Stunden Expositionszeit gegenüber gestellt. Abbildung 29 stellt die Zellviabilität im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle dar, Abbildung 30 im Verhältnis zur Ausgangszelldichte.

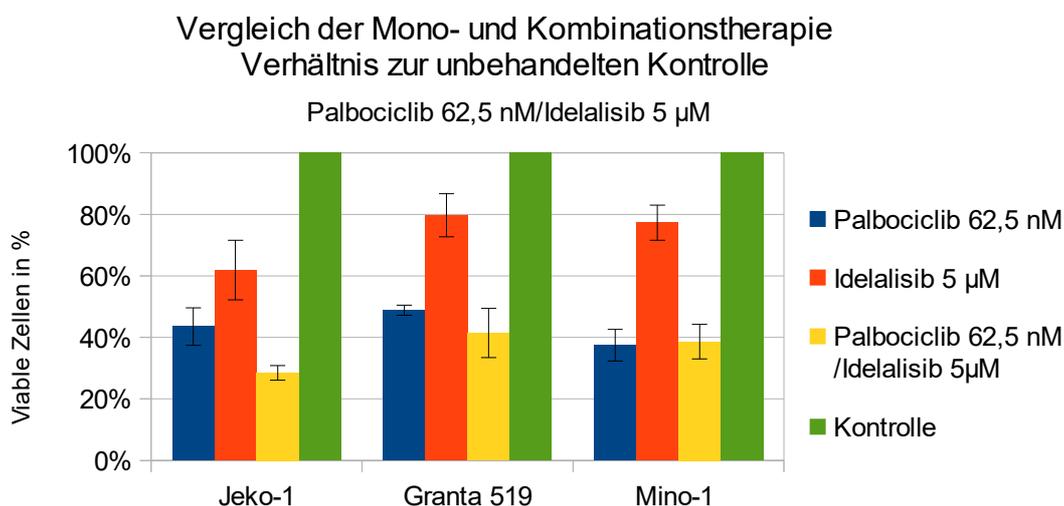


Abbildung 29: Vergleich der Zellviabilität von Palbociclib in Mono- und in Kombinationstherapie mit Idelalisib im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle

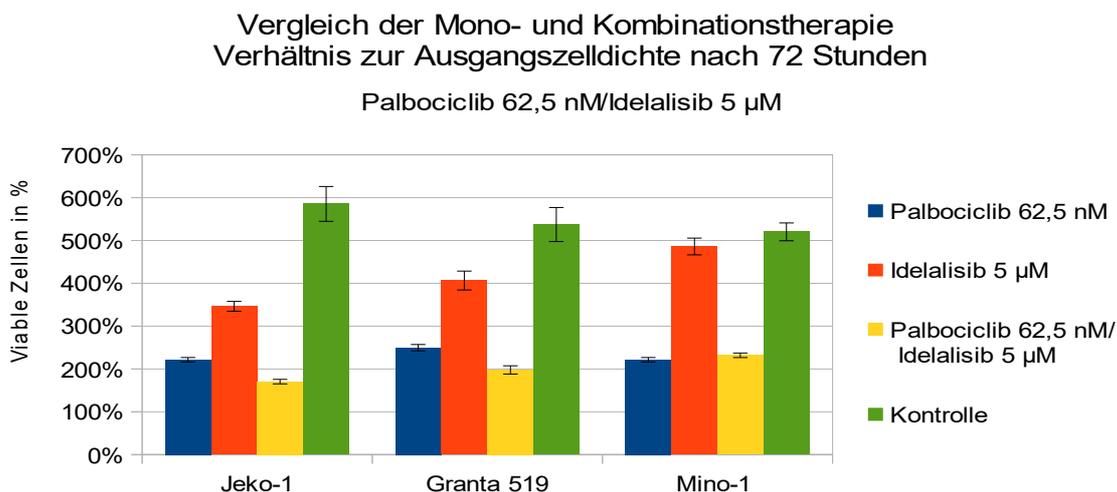


Abbildung 30: Vergleich der Zellviabilität von Palbociclib in Mono- und in Kombinationstherapie mit Idelalisib im Verhältnis zur Ausgangszelldichte

Fraction of Product

Wie Abbildung 31 zu entnehmen ist, hat sich die Kombination von Palbociclib mit Idelalisib als antagonistisch erwiesen. Mino-1 hat hier nach 24 Stunden einen additiven Effekt gezeigt, der sich im Verlauf mehr und mehr antagonistisch zeigte. Granta 519 und Jeko-1 haben nur eine antagonistische Wirkung gezeigt, wobei hier Jeko-1 den höchsten Wert nach 72 Stunden zeigte. Auch in dieser Kombinationsanalyse nahm der Antagonismus mit der Zeit zu.

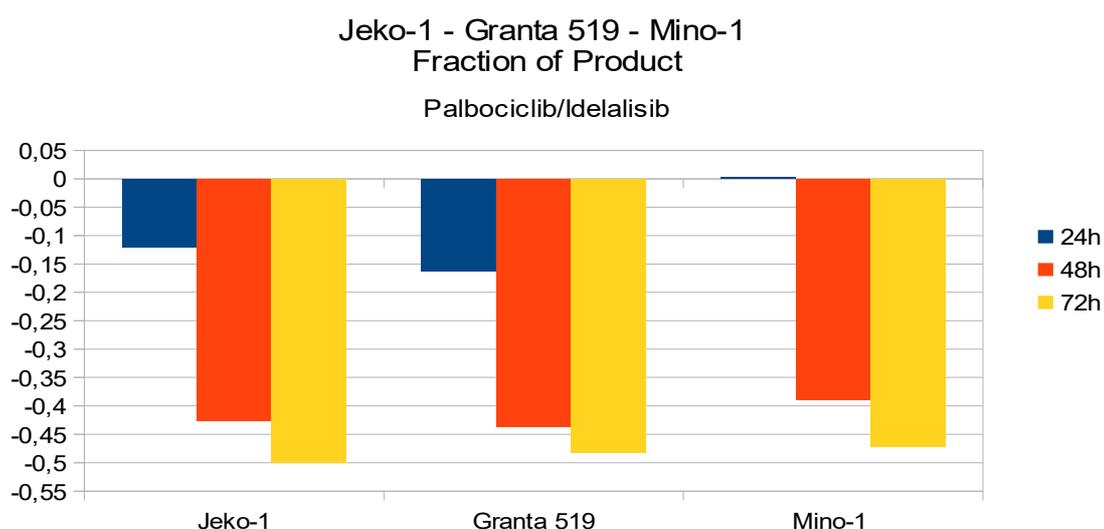


Abbildung 31 : Fraction of Product der Kombination Palbociclib und Idelalisib

Gezeigt ist das Fraction of Product der drei MCL-Zelllinien Jeko-1, Mino-1 und Granta 519, jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit mit 62,5 nM Palbociclib und 5 μ M Idelalisib. Werte über 0,1 zeigen einen Synergismus an, Werte unter -0,1 Antagonismus. Werte dazwischen zeigen einen additiven Effekt an.

5.5.2 Auswirkungen der Kombinationstherapie auf den Zellzyklus

Auch das Zellzyklusprofil der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien nach 24 Stunden unter der Kombinationsbehandlung mit 62,5 nM Palbociclib und 5 μ M Idelalisib war Gegenstand der Untersuchung. Auch hier zeigte sich eine ähnlich starke Verschiebung des Zellzyklus wie in der Kombination mit Ibrutinib. Die Kombination von Palbociclib mit Idelalisib resultierte auch hier in einer Zunahme der G1-Phase und entsprechenden Abnahme der S-Phase (siehe Abbildung 32).

Mino-1 hat den stärksten Zuwachs der G1-Phase mit 92% im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle von 44% gezeigt. Entsprechend nahm die S-Phase um 46,6% ab. Auch die G2-Phase nahm hier von 4,8% auf 1,9% ab. Bei Jeko-1 zeigte die G2-Phase eine leichte Erhöhung um 0,7% auf 8,2% unter der Behandlung. Auch die G1-Phase ist bis auf 82,1% angestiegen. Dies bedeutet einen Zuwachs von 34,5% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dieser Zuwachs ging mit einer Reduktion der S-Phase einher. Bei Granta 519 ging die G1-Zunahme mit einer Reduktion sowohl der S-Phase als auch mit der G2-Phase einher. Die Zunahme der G1-Phase betrug hier 35,8% von ursprünglich 30,9%.

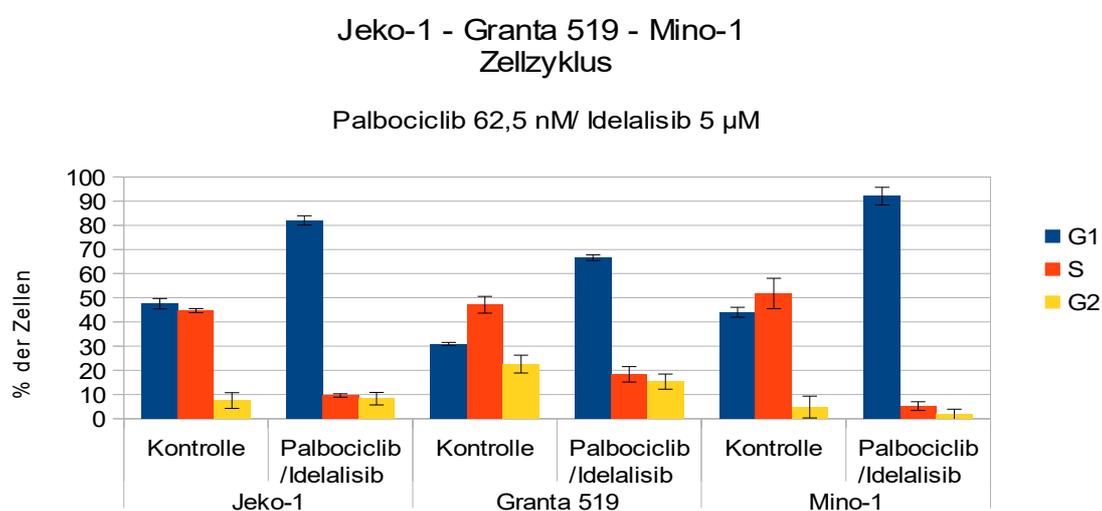


Abbildung 32: Zellzyklusanalyse mittels PI Färbung

Die drei Mantelzell-Lymphom-Zelllinien Jeko-1, Mino-1 und Granta 519 wurden mittels Palbociclib 62,5 nM und Idelalisib 5 µM behandelt und nach 24 Stunden durchflusszytometrisch untersucht. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten

Auch in der Kombination von Palbociclib und Idelalisib wurde ein starker G1-Arrest erwirkt. Entsprechend hat die S-Phase im Verhältnis abgenommen, mit nur leichten Veränderungen der G2-Phase.

5.5.3 Apoptoseinduktion durch die Kombinationstherapie

Die Apoptoseanalyse der Kombination von 62,5 nM Palbociclib und 5 μ M Idelalisib nach 24 Stunden mittels Annexin V-PE und 7-AAD zeigte keine signifikante Wirkung. Alle drei Zelllinien zeigten eine fast unveränderte Anzahl an viablen Zellen unter der Behandlung mit Palbociclib und Idelalisib. Jeko-1 hatte 92,1% viable Zellen in der unbehandelten Kontrolle. Durch die Behandlung konnte nur eine minimale Reduktion auf 90,6% viable Zellen erreicht werden. Um den gleichen Anteil stieg leicht die Zahl der frühapoptotischen Zellen. Recht ähnlich zeigte sich die Behandlung bei Mino-1. Auch hier gab es keine signifikante Verschiebung der viablen Zellen zu einer Apoptose hin. Granta 519 hat hingegen eine Abnahme der Viabilität von 10,2% gezeigt. Der Anteil von frühapoptotischen Zellen hat sich hier nicht verändert, dafür ist der Anteil an apoptotischen Zellen von 8,3% auf 15% gestiegen (siehe Abbildung 33).

Insgesamt zeigte sich somit auch in der Kombination von Palbociclib und Idelalisib keine Zunahme der Apoptoserate im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle bzw. zur Monotherapie.

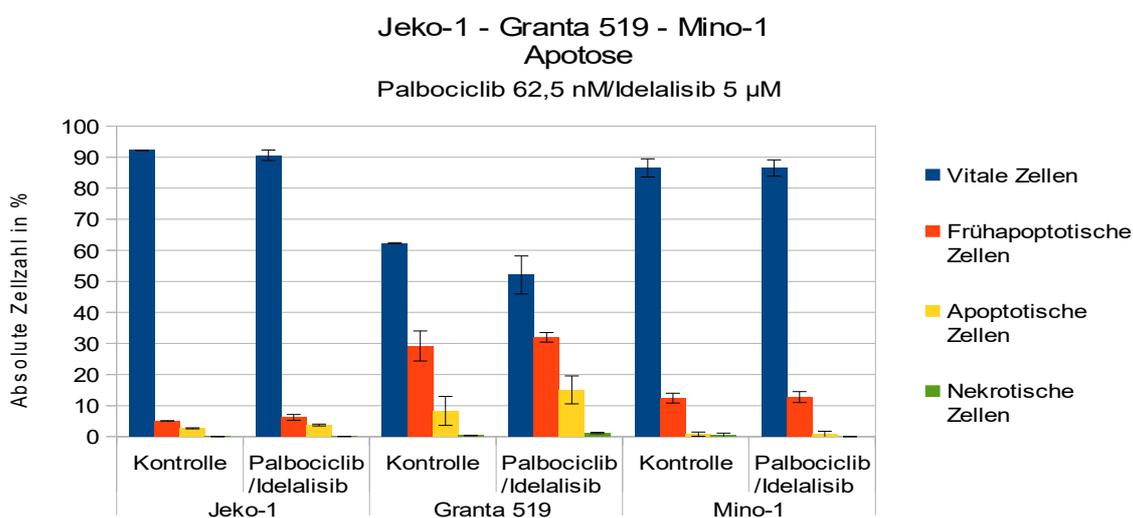


Abbildung 33: Apoptoseanalyse mittels Annexin V-PE und 7-AAD

Die drei Zelllinien Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 wurden über 24 Stunden mit Palbociclib 62,5 nM und Idelalisib 5 μ M inkubiert und per Durchflusszytometer ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

5.5.4 Zeitversetzte Gabe von Palbociclib und Idelalisib

Um eine etwaige verstärkte Wirkung von Idelalisib bei einem vorher induzierten G1-Arrest zu untersuchen, wurden die drei Zelllinien Jeko-1, Mino-1 und Granta 519 mit 62,5 nM Palbociclib inkubiert. 24 Stunden danach wurde Idelalisib in einer Dosis von 5 µM hinzugegeben und daraufhin die kombiniert behandelten Zellen über weitere 72 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden dann nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-Cell gezählt.

Der vorher induzierte G1-Arrest mittels Palbociclib hat bei allen drei untersuchten Zelllinien in der Kombination mit Idelalisib zu keiner signifikanten Verbesserung der Wirkung geführt (siehe Abbildung 34). Jeko-1 hat hier nach 72 Stunden eine Reduktion der viablen Zellen auf 33,3% gezeigt. Nach 24 Stunden sank die Viabilität um 30,6% auf 69,4% viable Zellen. Jeko-1 hat somit am besten auf die zeitversetzte Gabe von Palbociclib und Idelalisib angesprochen. Granta 519 hingegen zeigte nach 72 Stunden eine maximale Reduktion auf 51,6% an viablen Zellen. Initial nach 24 Stunden war die Zahl bei 72,2% und konnte nach weiteren 24 Stunden noch einmal um weitere 16% auf 56,2% abgesenkt werden. Interessant ist hier, dass sich die 48- und 72-Stunden-Werte nicht signifikant unterscheiden. Mino-1 hat die maximale Proliferationshemmung schon nach 48 Stunden mit einem Wert von 54,3% viabler Zellen gezeigt. Nach 72 Stunden ist die Zahl an viablen Zellen wieder leicht auf 57,5% angestiegen. Somit war die zeitversetzte Gabe von Palbociclib und Idelalisib bei Granta 519 und bei Mino-1 eher weniger effektiv als die gleichzeitige Exposition.

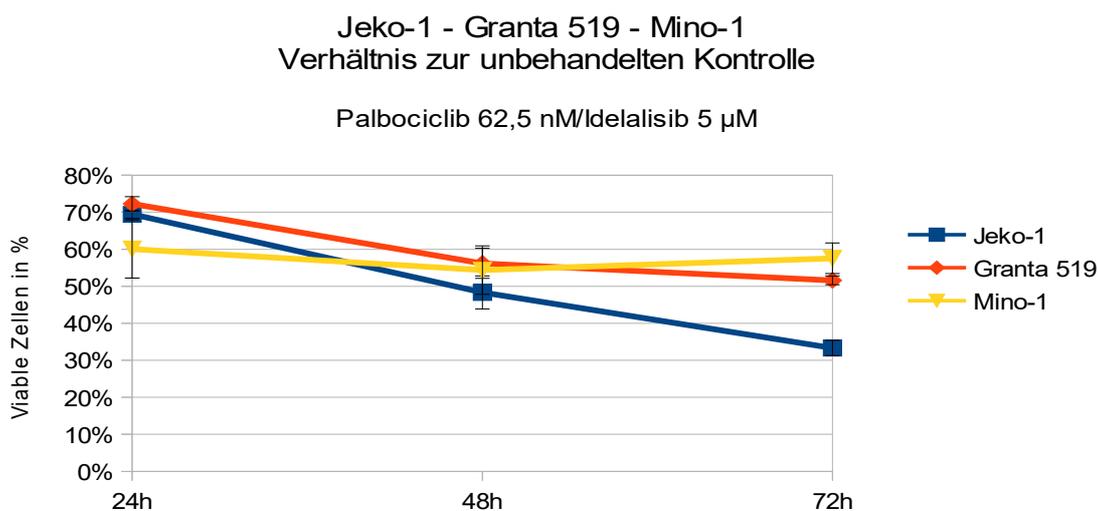


Abbildung 34: Kombinationstherapie mit Palbociclib und Idelalisib bei zeitversetzter Gabe.

Die drei Zelllinien Granta 519, Mino-1 und Jeko-1 wurden zunächst jeweils für 24 Stunden in Monotherapie mit 62,5 nM Palbociclib behandelt. Daraufhin wurden 5 μ M Idelalisib hinzugegeben und nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-Cell ausgewertet. Viable Zellen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Auswirkungen der zeitversetzten Gabe zeigten auch im zeitlichen Verlauf keine signifikant besseren Ergebnisse als bei gleichzeitiger Gabe. Nach 72 Stunden waren bei der Zelllinie Jeko-1 169% der Zellen proliferiert im Vergleich zur Ausgangszelldichte. Bei gleichzeitiger Gabe waren dies lediglich 70%. Interessanterweise war bei Granta 519 und Mino-1 die Zellproliferation zwischen 48 und 72 Stunden sprunghaft angestiegen (Granta 519 119%, Mino-1 75% nach je 72 Stunden) (siehe Abbildung 35). Initial zeigte sich kaum ein Unterschied in der Zellproliferation im Vergleich zur gleichzeitigen Gabe von Palbociclib und Idelalisib.

Jeko-1 - Granta 519 - Mino-1
Verhältnis zur Ausgangszeldichte

Palbociclib 62,5 nM/Idelalisib 5 μ M
zeitversetzt

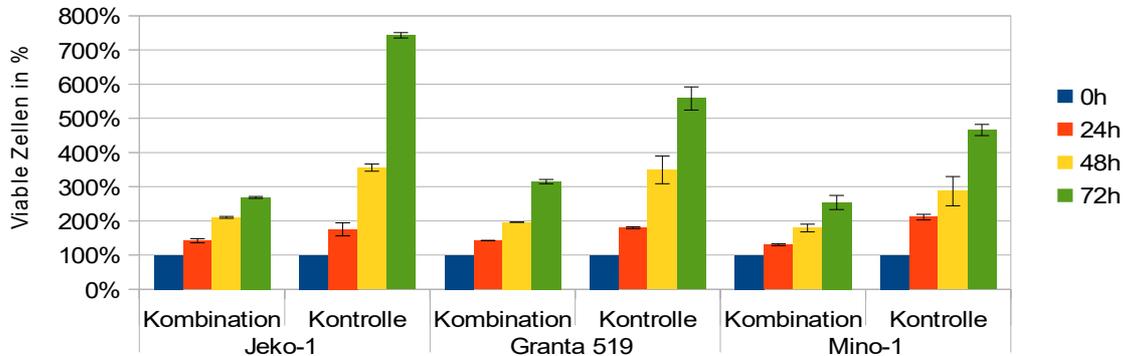


Abbildung 35: Kombinationstherapie mit Palbociclib und Idelalisib bei zeitversetzter Gabe.

Die drei Zelllinien Granta 519, Mino-1 und Jeko-1 wurden zunächst jeweils für 24 Stunden in Monotherapie mit 62,5 nM Palbociclib behandelt. Daraufhin wurden 5 μ M Idelalisib hinzugegeben und nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-Cell ausgewertet. Viable Zellen im Verhältnis zur Ausgangszeldichte nach Zugabe von Idelalisib – entspricht hier Zeitpunkt 0. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Die vorherige Gabe von Palbociclib 24 Stunden vor Zugabe von Idelalisib konnte keine stärkere Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur gleichzeitigen Gabe induzieren. Die Wirksamkeit nahm nach 48 Stunden sogar eher ab, so dass die Zellproliferation wiederum zunehmen konnte.

Fraction of Product

Die Analyse des Fraction of Product der zeitversetzten Gabe von Palbociclib und Idelalisib zeigte bei allen drei Zelllinien durchgehend einen antagonistischen Effekt. Hier zeigte sich Mino-1 im Gegensatz zur gleichzeitigen Gabe als schlechter ansprechend. Interessanterweise hat bei Granta 519 und Mino-1 der Antagonismus in seinen höchsten Werte nach 48 Stunden, um nach 72 Stunden wieder leicht abzunehmen (siehe Abbildung 36).

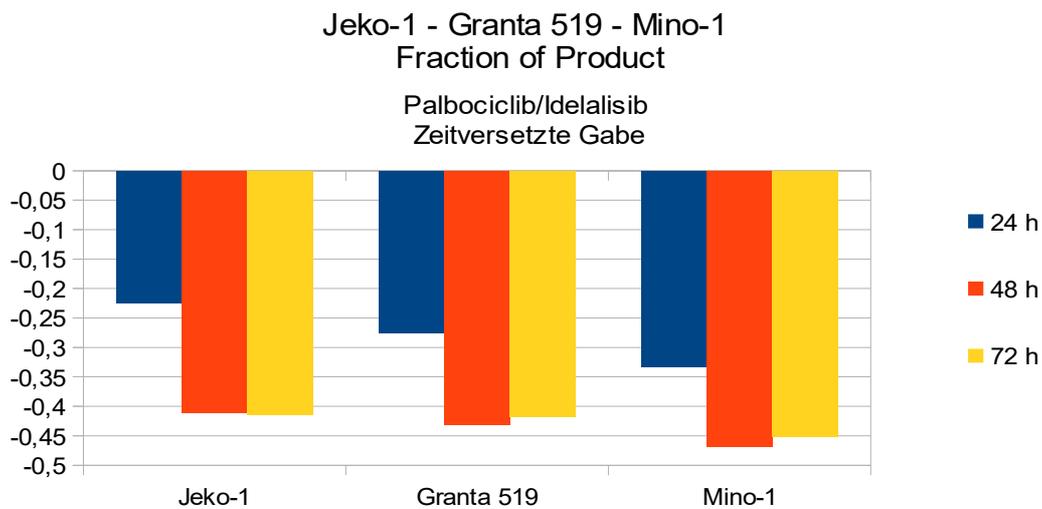


Abbildung 36: Fraction of Product der Kombination Palbociclib und Idelalisib bei 24 stündiger Vorinkubation mit Palbociclib.

Die drei MCL-Zelllinien Jeko-1, Granta 519 und Mino-1 wurden initial mit Palbociclib 62,5 nM inkubiert. 24 Stunden später wurde dazu Idelalisib mit einer Dosierung von 5 μ M hinzugegeben und dann nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-Cell gezählt. Werte über 0,1 zeigen einen Synergismus an, Werte unter -0,1 einen Antagonismus. Werte dazwischen einen additiven Effekt.

6. Diskussion

Aufgrund eines nur kurzzeitigen Ansprechens auf Chemotherapeutika und eines aggressiven Verlaufs weist das Mantelzell-Lymphom im Vergleich zu anderen Non-Hodgkin-Lymphomen eine sehr schlechte Prognose auf. Durch Hinzunahme des CD20-Antikörpers Rituximab konnten Therapieschemata (R-CHOP, B-R oder auch R-MCP) etabliert werden, die ein höheres Gesamtansprechen und insgesamt auch ein verlängertes Gesamtüberleben ermöglichen. Dennoch ist die Prognose mit einem mittleren Überleben von 3-5 Jahren in fortgeschrittenen Stadien relativ schlecht und eine Heilung kann potentiell nur mit einer allogenen Stammzelltransplantation erreicht werden (Dreyling et al., 2014). Durch diesen Sachverhalt sind neue therapeutische Ansätze zwingend notwendig, um die Prognose der Patienten verbessern zu können. Medikamente wie Palbociclib, Idelalisib oder auch Ibrutinib stellen durch ihre antitumorale Wirkung *in vitro* und *in vivo* Ansätze dar, die Therapie des Mantelzell-Lymphoms mit anderen Therapieschemata zu erweitern und generell zu verbessern. Da sich das Mantelzell-Lymphom durch eine Überexpression von Cyclin D1 bedingt durch die charakteristische Chromosomentranslokation $t(11;14)(q13;q32)$ auszeichnet, erscheint der CDK4/6-Inhibitor Palbociclib vielversprechend im Einsatz gegen das MCL zu sein.

6.1 Wirksamkeit von Palbociclib auf humane Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Palbociclib eine dosisabhängige antiproliferative Wirkung auf die untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien *in vitro* hat. Die Zelllinien Rec-1 und Granta 519 zeigten sich als relativ resistent, wohingegen Jeko-1, Z 138, Mino-1 und Maver-1 sich als sensibler gegenüber Palbociclib zeigten. Der Unterschied zwischen der sensibelsten und resistentesten Zelllinie betrug 27% bei einer Expositionszeit von 72 Stunden.

Es ist dennoch zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse der Zählungen immer auch in Abhängigkeit der aktuellen Splittzyklen oder auch des Zählzeitpunktes entstehen. Dementsprechend kann es zu einer Abweichung der Ergebnisse kommen. Die antiproliferative Wirkung von Palbociclib konnten auch Marzec et al. nachweisen. Mittels BrdU-Analyse hat sich hier Palbociclib in einer Dosierung von 50 nM schon nach 24 Stunden hinsichtlich der Proliferationshemmung als effektiv erwiesen. Auch hier zeigte sich Mino-1 als sensibelste Zelle, gefolgt von Jeko-1, die hier ein intermediäres Ansprechen zeigte. Granta 519 wurde hier nicht untersucht (Marzec et al., 2006).

6.1.1 Einfluss von p53

Durch verschiedene Mechanismen wie DNS-Schädigung, zellulären Stress, wie Hypoxie, oder auch durch andere zelluläre Noxen wird der Tumorsuppressor p53 aktiviert. Durch p53 kann in der Zelle Apoptose induziert werden, ein Zellzyklusarrest eingeleitet oder auch die Zelldifferenzierung beeinflusst werden. Damit übernimmt p53 eine wichtige Funktion in der Verhinderung der Tumorentstehung und trägt zum Schutz des Genoms bei (Stegh, 2012). Das Gen für p53, *TP53*, ist bei den drei untersuchten Zelllinien nur bei Mino-1 mutiert, was sich durch eine Punktmutation im Exon 5 des *TP53*-Gens zeigt. Jeko-1 und Granta 519 zeigen beide p53-Wildtyp-Konfiguration (Amin et al., 2003). Betrachtet man nun die Wirkung von Palbociclib in Abhängigkeit von Mutationen des Tumorsuppressorgens, korreliert die Wirkung nicht mit dem Mutationsstatus. Mino-1 mit mutiertem *TP53*-Status hat am besten auf Palbociclib angesprochen. Dennoch hat auch Jeko-1 mit einer guten Reduktion der Zellproliferation auf die Behandlung mit Palbociclib reagiert. Granta 519 hingegen hat verglichen mit ersteren beiden Zelllinien weniger gut auf Palbociclib angesprochen. Somit zeigt sich in den sensiblen Zelllinien Mino-1 und Jeko-1 sowohl p53 im Wildtyp-Status als auch mutiertes p53. Ob der p53-Status somit relevant für die Sensibilität von Palbociclib ist, lässt sich abschließend nicht klären.

Allerdings konnten Amin et al. mittels Westernblot-Analyse keine Expression von p53 in Jeko-1 nachweisen. Gleichzeitig zeigt die Expressionsanalyse von Mino-1 die

stärkste Expression von p53 (Amin et al., 2003). Durch die Mutation des *TP53*-Gens in der Zelllinie Mino-1 kann es zu einer unkontrollierten Zellproliferation kommen, durch welche es zu einer sehr viel häufigeren Teilung der Zellen kommt. Bei Mino-1 kommt es etwa alle 48 Stunden zu einer Verdoppelung der Zellzahl (Lai et al., 2002). Somit wird der Zellzyklus häufiger durchlaufen, bedingt durch die erhöhte Proliferation. Dementsprechend könnte dies ein Grund sein, dass Palbociclib, als Inhibitor der Zellzyklusproliferation ein gutes Ansprechen bei Mino-1 gezeigt hat. Dennoch haben auch Granta 519 und Jeko-1 ähnliche Verdoppelungszeiten wie Mino-1 (Drexler et al., 2002). Somit scheint es trotz ähnlicher Verdoppelungszeiten durch die Mutation im *TP53*-Gen dennoch zu einem Proliferationsvorteil zu kommen. Mino-1 hat in der FACS-Analyse sogar die stärkste Verschiebung hin zur G1-Phase unter der Behandlung mit Palbociclib gezeigt. Auch dies könnte durch eine stärkere Zellproliferation bedingt sein. Dementsprechend lässt sich auch das gute Ansprechen von Jeko-1 erklären. Die Zelllinie Jeko-1 weist eine p53-Defizienz auf, die somit zu einem ähnlichen Verhalten führen könnte wie bei Mino-1. Hernandez et al. konnten zeigen, dass eine Mutation von p53 mit den aggressiven Varianten des Mantelzell-Lymphoms einhergeht. Das Überleben der Patienten, die eine *TP53*-Mutation im MCL zeigten, hatte eine signifikant schlechtere Rate als bei Patienten ohne Mutation. Gleichzeitig zeigte sich in den MCL-Fällen, die mit einer langsamen Zellprogression und der indolenten Verlaufsform einhergingen, keine Mutation von p53 (Hernandez et al., 1996).

6.1.2 Relevanz des CDK4-Inhibitors p16^{INK4a}

In der Charakterisierung von Amin et al. fällt auf, dass Granta 519 die einzige Zelllinie von den drei in dieser Arbeit untersuchten ist, die keine Expression von p16^{INK4a} zeigt. Das gänzliche Fehlen von p16^{INK4a} oder das Auftreten von Mutationen in diesem Protein kann die Tumorproliferation durch mangelnde Inhibition der CDKs begünstigen. Granta 519 hat unter der Behandlung mit Palbociclib die geringste Verschiebung des Zellzyklus gezeigt. In Anbetracht der hier fehlenden zusätzlichen Inhibition von CDK4 durch p16^{INK4a}, wäre auch dies eine mögliche Erklärung für die progressive Proliferation auch unter Palbociclib.

p16^{INK4a} stellt einen wichtigen Inhibitor dar, der direkt CDK4 hemmt und somit von einer Komplexbildung mit Cyclin D1 abhält (Serrano et al., 1993). Der Verlust einer Expression von p16^{INK4a} führt zu einer verstärkten Tumorpheression und ist zu anderen mit aggressiveren Formen des Mantelzell-Lymphoms assoziiert. Als eine weitere Ursache für aggressive und stark proliferierende MCL-Formen wurde eine Methylierung der Promoterregion des Gens für p16^{INK4a} identifiziert, was ebenfalls in einer verminderten Expression des Proteins p16^{INK4a} resultiert (Hutter et al., 2006; Pinyol et al., 1998). Es wurden aber auch Fälle von aggressiven Varianten gefunden, die eine Überexpression von p16^{INK4a} gezeigt haben. Dies ging dafür mit einem Verlust von p21^{WAF/kip1} oder p53 einher (Pinyol et al., 1997). Auch dies könnte eine Erklärung für das schlechte Ansprechen von Granta 519 auf die verschiedenen Therapeutika sein. Granta 519 hat sich unter der Behandlung mit allen verwendeten Therapeutika als die resistenteste Zelllinie gezeigt, die unabhängig der behandelten molekularen Zielstruktur in der Proliferationshemmung deutlich schlechter angesprochen hatte.

Katsumi et al. konnten zeigen, dass Zellen des bösartigen Rhabdoidtumors besser auf Palbociclib ansprachen, je niedriger die Expression von p16^{INK4a} ausfiel. Die Sensitivität von Palbociclib war hier indirekt proportional mit der Expressionsrate von p16^{INK4a} korreliert. Zusätzlich war auch die Aktivität von CDK4 indirekt proportional zum p16^{INK4a}-Expressionslevel (Katsumi et al., 2011). Nach diesem Sachverhalt hätte Granta 519 jedoch die sensibelste Zelllinie in der Behandlung mit Palbociclib gewesen sein müssen. Bei einem vollständigen Verlust von p16^{INK4a} ist die Aktivität von CDK4 nicht mehr reguliert und massiv verstärkt. Der Grund warum Granta 519 sich dennoch als weniger sensitive Zelllinie gezeigt hat, kann abschließend nicht gänzlich geklärt werden.

6.1.3 CDK-Status und Zellzyklus

In dieser Arbeit wurde auch die Wirkung von Palbociclib auf den Zellzyklus nach 24 Stunden Inkubationszeit mit der Dosis von 62,5 nM untersucht. In allen untersuchten Zelllinien konnte eine Zunahme der G1-Phase auf bis zu 50% durch die Verwendung von Palbociclib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erreicht werden, bei

gleichzeitiger Abnahme der S-Phase um ebenfalls fast 50%. Palbociclib zeigte somit einen potenten G1/S-Arrest auf, wobei die G2/M-Phase nur minimal beeinflusst wurde. Der Unterschied in der G2/M-Phase betrug zwischen der behandelten und unbehandelten Probe lediglich 2,7%. Die Intensität des Zellzyklusarrestes korrelierte hierbei mit der Sensitivität der Zelllinien in der Viabilitätsanalyse. Die Zelllinie Mino-1, die bei den Zählproben am stärksten in der Proliferation gehemmt wurde, zeigte die stärkste Zunahme der G1-Phase von 51,7% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wohingegen Granta 519 als resistanteste Zelllinie nur eine Zunahme von 31,7% gezeigt hat.

Diese starke Verschiebung des Zellzyklus hin zu einem G1-Arrest durch Palbociclib wurde auch in anderen Tumorentitäten nachgewiesen, wie in Brustkrebszellen oder auch in Zellen des Kolonkarzinoms (Fry et al., 2004).

Malumbres et al. haben herausgefunden, dass auch bei CDK4/6-Defizienz eine normale Zellproliferation möglich ist. In Knockout-Mäusen war bei Abwesenheit von CDK4/6 im embryonalen Zellstadium eine Organogenese und auch eine Zellproliferation festzustellen. Sie führen dies auf die Möglichkeit einer Aktivität von CDK2 zurück, die dazu führt, dass ein Übertritt in die S-Phase möglich ist. Hierbei kommt es alternativ zu einer Komplexbildung von Cyclin D mit CDK2 (Malumbres et al., 2004). Auch dadurch ist das schlechte Ansprechen einzelner Zelllinien zu erklären. Rec-1 oder auch Granta 519 haben in der Monotherapie mit Palbociclib ein relativ schlechtes Ansprechen gezeigt. Mit der Möglichkeit die Inhibition von CDK4/6 durch Palbociclib über CDK2 zu umgehen, kann damit auch eine zunehmende Proliferation trotz Behandlung mit Palbociclib erklärt werden.

Gleichwohl konnte Parker et al. mit dem Pan-CDK-Inhibitor Flavopiridol eine Inhibition der Zellproliferation bei verschiedenen Zellen der hämatopoetischen Zellreihe abhängig von der verwendeten Dosierung erwirken. Mit einer Dosis von 100 nM Flavopiridol kam es hier zur Reduktion zwischen 35% und 80 % nach 48 stündiger Inkubation. Betrachtet man allerdings den Umstand, dass es sich bei Flavopiridol um einen Pan-CDK-Inhibitor handelt, ist die Wirkung nur leicht stärker, als die Wirkung von Palbociclib in der hier vorliegenden Arbeit auf die MCL-Zelllinien. Somit bleibt das Ergebnis von Flavopiridol hinter den Erwartungen zurück, wenn man sich vergegenwärtigt, dass durch den Einsatz dieses Inhibitors, neben CDK4/6 auch CDK2

inhibiert wird, also auch eine etwaige Zellproliferation, die durch CDK2 vermittelt wird (Parker et al., 1998). Unter diesem Gesichtspunkt hat Flavopiridol auch in klinischen Studien nicht überzeugt (Kouroukis et al., 2003). Somit müssen für die Resistenz der CDK-Inhibitoren noch andere Mechanismen verantwortlich sein, die die Zellzyklusproliferation trotz wirksamer Inhibition der CDKs zu einem ungestörten Ablauf des Zellzyklus führen. In einer ersten Studie von Leonard et al. mit 17 Patienten hat sich Palbociclib durch eine Herabsetzung der Tumorzellproliferation und des Tumormetabolismus im MCL als wirksam erwiesen. Sie konnten zeigen, dass durch die Gabe von Palbociclib, sowohl die Rate an pRB um bis zu 40 % gesenkt werden konnte, als auch die Rate an Ki-67-positiven Zellen abgenommen hat. Von insgesamt 17 Patienten erreichten 5 Patienten eine PFS von mehr als einem Jahr. Eine CR konnte bei einem Patienten festgestellt werden und eine PR bei zwei Patienten, was insgesamt eine Ansprechrate von 18% ausmacht. Hier zeigte sich ein Rückgang der Zellproliferation gemessen anhand des FLT-SUVmax teilweise von über 90%, was mit dem Ki-67-Index korrelierte (Leonard et al., 2012).

6.1.4 Tumorspezifische Wirkung

Die tumorspezifische Wirkung von Palbociclib wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht. Dazu wurden zwei gesunde Probandenproben mit Palbociclib in Dosierungen von 50 nM bis 10 μ M inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden gezählt. Es zeigte sich keine signifikante Reduktion der gesunden viablen Zellen in ihrer Proliferation. Nach 72 Stunden war überhaupt erst eine Wirkung zu erzielen und dann auch nur in recht hohen Dosierungen. Bei niedrigen Dosierungen wurde die Zellproliferation nur minimal beeinflusst, so dass die Zellzahl relativ konstant geblieben ist. Die maximale Reduktion zeigte sich mit 61,7% bei einer verwendeten Dosierung von 5 μ M Palbociclib nach 72 Stunden.

Im zeitlichen Verlauf war unter der Behandlung mit Palbociclib weder eine signifikante Reduktion, noch eine starke Proliferation der Zellzahl zu verzeichnen. Die gesunden Proben bewegten sich in einem Bereich zwischen 80% und 100% im Verhältnis zur Ausgangszell-dichte über die gesamten 72 Stunden.

Somit zeigt Palbociclib eine gute Wirksamkeit gegenüber MCL-Zelllinien und – zumindest in niedrigeren Dosierungen – keine Wirkung gegenüber gesunden B-Zellen. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass die gesunden Probandenproben generell keine signifikante Proliferation *in vitro* zeigten. Palbociclib als Inhibitor des Zellzyklus – mittels Arretierung in der G1-Phase – kann somit bei nicht proliferierenden Zellen nicht ansetzen, da sich die Zellen nicht teilen. Somit muss die tatsächliche Aktivität von Palbociclib gegenüber gesunden proliferierenden B-Zellen *in vivo* verifiziert werden.

6.2 Wirksamkeit von Palbociclib in Kombinationstherapie auf humane Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

Im MCL kommt es nicht nur zur Überexpression von Cyclin D1, sondern auch zu anderen Mechanismen, die eine Tumorgenese begünstigen. So sind verschiedene Signalpfade im MCL alteriert, wodurch es zur Tumorprogression kommt. BTK als Bestandteil des BCR-Signalweges stellt ein wichtiges Protein in der Initialisierung von Transkriptionsfaktoren dar. Eine sehr wichtige Zielstruktur von BTK ist hier NF- κ B, durch dessen Aktivierung mehrere hundert Gene transkribiert werden, die für das zelluläre Zytoskelett und für die Zellproliferation relevant sind (Mohamed et al., 2009). Durch Ibrutinib wird BTK potent gehemmt und eben diese Effekte unterbunden. Durch gleichzeitige Gabe von Palbociclib könnte über die Inhibition der CDKs respektive der Zellzyklusprogression und dadurch bedingter Transkriptionshemmung, die Zellproliferation auf zwei verschiedenen molekularen Ebenen gehemmt werden. Ohne funktionierende Zellzyklusprogression und bei gleichzeitiger Hemmung eines zentralen Mechanismus der Zellkommunikation sollte es möglich sein, die Zellproliferation signifikant zu senken.

6.2.1 Palbociclib in Kombination mit Ibrutinib

In der Kombinationsanalyse mit 62,5 nM Palbociclib und 5 µM Ibrutinib konnte eine verstärkte Zellzahlreduktion nur teilweise erreicht werden. Am besten hat Jeko-1 angesprochen. Sind in der jeweiligen Monotherapie mit Palbociclib und Ibrutinib Werte nach 72 Stunden von 43,5% bzw. 41,3% zu verzeichnen, konnte in der Kombination eine Zellzahlreduktion von 18,9% erreicht werden. Auch bei Mino-1 und Granta 519 konnte durch die Hinzunahme des BTK-Inhibitors eine Zunahme der Proliferationshemmung erreicht werden.

Allerdings hat Palbociclib in der Monotherapie initial schon einen sehr starken Rückgang der Zellzahl erwirkt. Außer bei Jeko-1 konnte durch Ibrutinib nur eine leichte zusätzliche Inhibition erreicht werden, die eine Wirkungsverstärkung von etwa 10% zeigte. Jeko-1 hat hier eine Verstärkung von 20% gezeigt. Somit wird in der Kombinationsanalyse mit Palbociclib und Ibrutinib ein großer Teil der Zellreduktion schon durch Palbociclib alleine getragen.

Im Verhältnis zur Ausgangszelldichte konnte durch die Kombination von Palbociclib und Ibrutinib über den gesamten zeitlichen Verlauf bei Jeko-1 eine starke Proliferationshemmung induziert werden. Über die gesamten 72 Stunden nahm die Proliferation nicht über 10% zu. Auch die Proliferation von Mino-1 und Granta 519 wurde nach 48 Stunden relativ gut gehemmt. Jedoch nahm die Proliferation der beiden Zelllinien nach 72 Stunden auf fast die doppelte Zellzahl im Vergleich zur Ausgangszelldichte zu. Somit war hier eine zunehmende Resistenz zu verzeichnen. Dennoch hat die Kombination hier bessere Ergebnisse geliefert als die Monotherapie. Entsprechend hat die Proliferation aller Zellen in der Monobehandlung mit Ibrutinib kontinuierlich zugenommen, um bei der resistentesten Zelllinie Granta 519 auf den vierfachen Wert der Ausgangszelldichte anzusteigen. Somit konnte die Proliferation über Zeit durch die Hinzunahme von Ibrutinib bei allen drei Zelllinien zusätzlich gehemmt werden.

In der entsprechenden Analyse des Zellzyklus haben sich ähnliche Ergebnisse gezeigt. Palbociclib in Kombinationstherapie mit Ibrutinib zeigte sich in der Zellzyklusanalyse der Monotherapie alleine mit Palbociclib nicht überlegen. Ibrutinib in Monotherapie zeigte bei der Zellzyklusanalyse eine Zunahme der G1-Phase zwischen 5% und 15%.

Auch hier konnte in der Kombinationsanalyse kein Zugewinn der G1-Phase im Vergleich zur Monotherapie mit Palbociclib erreicht werden. Ibrutinib zeigte hier eine Wirkung auf die G2/M-Phase. Bei der Zelllinie Jeko-1 zeigte sowohl die Monotherapie mit Ibrutinib als auch die Kombinationstherapie mit Palbociclib eine leichte Zunahme der Arretierung auch in der G2/M-Phase von etwa 6%. Bei den anderen Zelllinien blieb dieser Effekt aus. Chiron et al. haben herausgefunden, dass ein schlechtes Ansprechen auf Ibrutinib im Zusammenhang mit einer Mutation des BTK steht. An der entsprechenden Ibrutinib-Bindungsstelle des BTK konnte eine C481S-Missense-Mutation gefunden werden, allerdings nur bei Patienten, die nach initialer Therapie mit Ibrutinib ein progressives Wachstum des MCL zeigten. Sie konnten zeigen, dass durch die Arretierung der MCL-Zellen in der G1-Phase ein besseres Ansprechen durch Ibrutinib erzielt werden kann (Chiron et al., 2014). Dies unterstreicht die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse, dass durch die Ibrutinib-Monotherapie *in vitro* ein schlechteres Ansprechen der Zellen erzielt werden konnte, als in der Kombinationstherapie. Das schlechte Ansprechen von Granta 519 in der Monotherapie mit Ibrutinib korreliert mit dem Ansprechen der Zelllinie auf die Behandlung in Bezug auf den Zellzyklus, bei welchem Granta 519 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nur einen leichten Zuwachs der G1-Phase zeigte. Dies lässt sich dadurch erklären, dass durch Inhibition des BTK es zu einer möglichen Hochregulation anderer Signalmetabolite kommt, welche über einen alternativen Weg die Zellproliferation aufrechterhalten. So wird durch eine Inhibition des BTK zwar die B-Zell-Rezeptor-Signalkaskade inhibiert, gleichzeitig kann aber über den PI3K-AKT-mTOR-Signalweg immer noch eine Zellproliferation vonstatten gehen. Relevant für die unterschiedliche Wirksamkeit der Kombinationstherapie von Palbociclib und Ibrutinib zum einen in der hier vorliegenden Arbeit zum anderen von Chiron et al. könnte der Einfluss des Mikromileus *in vivo* sein. Allerdings zeigt Ibrutinib in klinischen Studien schon vielversprechende Ergebnisse.

In einer großen Phase-2-Studie von Wang et al. wurde Ibrutinib bei Patienten mit rezidivierendem oder refraktären MCL eingesetzt. Von 111 Patienten zeigten 75 (68%) ein Ansprechen auf die Monotherapie mit Ibrutinib, wobei bei 21 % ein komplettes und bei 47% nur ein teilweises Ansprechen zu verzeichnen war. Bei einem mittleren Follow Up von 15,3 Monaten hat sich eine mittlere Ansprechdauer von 17,5 Monaten und ein

mittleres PFS von 13,9 Monaten gezeigt. Nach 18 Monaten haben noch 58% der Patienten gelebt (Wang et al., 2013).

6.2.2 Palbociclib in Kombination mit Idelalisib

Marzec et al. konnten zwei verschiedene Isoformen des Cyclin D1 identifizieren. In allen untersuchten Zelllinien wurde Cyclin D1a exprimiert. Die zweite Isoform hingegen, Cyclin D1b, wurde nur in 3 von 4 MCL-Zelllinien exprimiert. Relevant für diese Arbeit zeigt sich das Ergebnis von Marzec et al. dahingehend, dass Jeko-1 sowohl Cyclin D1a als auch Cyclin D1b exprimiert. Mino-1 hingegen hat keine Expression von Cyclin D1b gezeigt (Marzec et al., 2006). Von diesen zwei verschiedenen Splicevarianten des Cyclin D1, ist Cyclin D1b hierbei die Isoform, die stärker onkogen wirkt. Cyclin D1b wirkt ebenfalls positiv auf die Zellzyklusproliferation, in dem es mit CDK4 eine Komplexbildung eingeht. Bedingt durch das Fehlen einer COOH-Gruppe können GSK-3 β und CRMI nicht angreifen und für einen Export aus dem Zellkern sorgen. Durch Akkumulation dieser Cyclin D1-Isoform kann es zur Tumorgenese kommen (Lu et al., 2003; Diehl et al., 2003). Weiterhin könnte für die verstärkte Aktivierung von Cyclin D1 eine dysregulierte Wirkung von eIF4E verantwortlich sein. Durch die Aktivierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalweges werden viele *downstream*-Signalmoleküle aktiviert, unter anderem das *eukaryotic initiation factor*(EIF)-4E *binding protein* (4E-BP1). 4E-BP1 bindet in hypophosphoryliertem Zustand an EIF-4E, wodurch die Translation gehemmt wird. Durch Hyperphosphorylierung von 4E-BP1 durch den PI3K-AKT-mTOR-Signalweg kommt es dann zur Freigabe von EIF-4E und damit zur Translation (Haritunians et al., 2007; Gingras et al., 2001). Dadurch, dass im MCL oftmals auch der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg dysreguliert ist, kann es über diesen Mechanismus zu einer erhöhten Translation von Cyclin D1 kommen. Durch diese Dysregulation von EIF-4E, kann es zu erhöhten Konzentrationen von Cyclin D1-Protein in der Zelle kommen. Rosenwald et al. haben gezeigt, dass die direkte Überexpression von Cyclin D1-mRNA nicht gleichzeitig zu einer vermehrten Translation und damit einer erhöhten Mengen an Protein führt. Wenn hingegen EIF-4E

überexprimiert ist, erhöht sich signifikant die Menge an Cyclin D1-Protein (Rosenwald et al., 1993).

Somit wurde in der vorliegenden Arbeit weiterhin untersucht, wie sich die kombinierte Gabe des CDK4/6-Inhibitors Palbociclib zusammen mit dem PI3K-Inhibitor Idelalisib auf die Zellproliferation auswirkt. Bei den gegebenen Dosierungen von 62,5 nM Palbociclib und 5 µM Idelalisib konnte eine zeitabhängige Proliferationshemmung erzielt werden, die sich gegenüber der Monotherapie mit Palbociclib in Teilen überlegen zeigte. Jeko-1, die in der Monobehandlung mit Palbociclib ein gutes Ansprechen auf eine Reduktion von 43,5% zeigte, konnte in der Kombinationstherapie zusätzlich um 15% nach 72 Stunden in ihrer Zellproliferation gehemmt werden. Erst nach 48 Stunden hat sich die Kombinationstherapie der Monotherapie mit Palbociclib als überlegen erwiesen und konnte die Reduktion um etwa 10% steigern. Interessanterweise konnte bei der Zelllinie Mino-1 die Proliferationshemmung zu allen Zeitpunkten nicht weiter gesteigert werden, womit die Inhibition der Kombinationstherapie gleich der Monotherapie mit Palbociclib war. Nach 24 Stunden war das Ergebnis der Kombinationstherapie mit 95,5% signifikant geringer als in der Monotherapie mit Palbociclib, welches hier bei 71,4% lag.

Betrachtet man die Ergebnisse im Verhältnis zur Ausgangszelldichte, zeigte sich bei allen drei untersuchten Zelllinien ein kontinuierlicher Anstieg der Zellzahl, der nach 72 Stunden auf weniger als das doppelte angestiegen war. Lediglich Mino-1 hat sich hier im Verlauf als resistent gezeigt und nach 72 Stunden eine Proliferationsrate von 131% gezeigt. Dennoch hat sich auch hier gezeigt, dass die Ergebnisse der Proliferationshemmung tendenziell von Palbociclib alleine getragen wurden. Idelalisib hat in der Monotherapie bei Mino-1 eine Proliferationsrate von 199% nach 48 Stunden und 386% nach 72 Stunden erreicht. Dies blieb weit hinter den Ergebnissen der Monotherapie mit Palbociclib bzw. der Kombinationstherapie zurück.

Die in der Arbeit untersuchte Wirkung der Kombinationstherapie mit Palbociclib und Idelalisib auf den Zellzyklus, zeigte entsprechend der Monotherapie mit Palbociclib ebenfalls eine Arretierung des Zellzykluses in der G1-Phase. Es konnte jedoch bei allen untersuchten Zelllinien kein Zugewinn der G1-Phase durch die Hinzunahme von Idelalisib gewonnen werden, ähnlich wie es auch schon in der Behandlung mit Ibrutinib der Fall war. Die Monotherapie mit Idelalisib hat einen Zuwachs der G1-Phase

zwischen 5% und 15% erreichen lassen mit einer gleichzeitig einhergehenden Reduktion der S-Phase. Die G2/M-Phase zeigte hier keine Veränderung. Diese durch Idelalisib erreichte Rate der Verschiebung des Zellzyklus konnte in der gleichzeitigen Gabe mit Palbociclib keine additive Wirkung entfalten. Dies zeigt, dass Idelalisib als PI3K-Inhibitor bei gleichzeitiger Gabe mit Palbociclib keinen Einfluss auf die Intensität der Wirkung von Palbociclib hat und somit die Arretierung allein durch Palbociclib hervorgerufen wird.

Interessanterweise zeigte allerdings Granta 519 einen minimalen Zuwachs der G1-Phase um 4,1% in der Kombinationstherapie. Dies ging hier allerdings mit einer Reduktion der G2/M-Phase einher. Hier reduziert sich die G2/M-Phase um rund 5% im Vergleich zur Monotherapie mit Palbociclib oder der unbehandelten Kontrolle. Granta 519 ist somit die einzige untersuchte Zelllinie, die unter der Behandlung mit Palbociclib und Idelalisib eine Verschiebung des Zellzyklus nicht nur von der S-Phase in Richtung G1-Phase, sondern auch eine Abnahme der G2-Phase zeigte.

Franco et al. haben durch die Kombinationstherapie mit einem PI3K/mTOR-Inhibitor und Palbociclib eine komplette Unterbindung der Zellproliferation in Zellen des Pankreastumors gezeigt. Dies ging einher mit einer Suppression von Cyclin D1 und Cyclin E1 durch die Kombinationstherapie. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibition mittels Palbociclib die Transkription von Cyclin E verringert wurde, da durch den Zellzyklusarrest entsprechende Proteine in der S-Phase transkribiert werden konnten (Franco et al., 2014).

Idelalisib hat in ersten klinischen Studien auch beim MCL gute Ergebnisse gezeigt. Kahl et al. haben eine Phase-I-Studie mit 40 Patienten mit refraktärem oder rezidivierenden MCL über 48 Wochen angesetzt, wobei gezeigt werden konnte, dass durch Idelalisib ein ORR von 40 %, eine mittlere DOR von 2,7 Monaten und eine PFS von 3,7 Monaten erreicht werden konnte. Weitere Studien mit Idelalisib in Kombination mit Lineladomid und Rituximab werden momentan durchgeführt (Kahl et al., 2014).

Betrachtet man die Wirkung einer Aktivierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalweges, ist der Hauptmechanismus die Aktivierung von AKT. Die meisten von AKT phosphorylierten Proteine werden in ihrer Aktivität gehemmt. Wichtige Proteine, die durch AKT gehemmt werden und damit ihre Wirkung auf den Zellzyklus, Apoptose und Transkription nicht mehr ausüben können, sind FKHR-L1, Bad und auch GSK-3 β .

Durch die Phosphorylierung von GSK-3 β kommt es normalerweise zum einen zu einer Inaktivierung oder auch zu einem Abbau entsprechender Proteine. Unter anderem ist hier ein wichtiges Ziel Cyclin D1 (Cantley et al., 2002). Dieser Mechanismus wird durch AKT und entsprechender Inhibition von GSK-3 β gehemmt, so dass es zu einer verstärkten Wirkung von Cyclin D1 kommt. Durch eine Inhibition von PI3K mittels Idelalisib, kommt es zu einer verringerten Aktivierung von AKT und dementsprechend auch zu einer verringerten Phosphorylierung der Zielproteine von AKT, die dadurch ihre Wirkung stärker entfalten und uneingeschränkt auf den Zellzyklus wirken können. Die Kombination aus Palbociclib und Idelalisib ergänzt sich genau an dieser Stelle. Durch Inhibition von PI3K durch Idelalisib wird letztendlich die Inhibition von GSK-3 β verringert und dadurch seine Wirkung auf Cyclin D1 erhöht. Cyclin D1 wird von GSK-3 β an einem Threonin-Rest in Position 286 phosphoryliert und daraufhin im Proteasom abgebaut und verliert somit seine Wirkung auf den Zellzyklus (Diehl et al., 1998). Gleichzeitig setzt Palbociclib über eine Inhibition von CDK4/6 an anderer Stelle an. So kommt es auf der einen Seite durch eine verringerte Konzentration von Cyclin D1 und auf der anderen Seite durch direkte Inhibition essentieller Bestandteile des Cyclin D/CDK 4/6-Komplexes zu einer theoretischen Wirkverstärkung.

6.2.3 Wirksamkeit einer zeitversetzten Gabe von Palbociclib und Idelalisib

Der Übergang von der G1-Phase zur S-Phase ist für die Zellproliferation ein entscheidendes Ereignis. Nur wenn die Zelle in die S-Phase kommt, können Proteine gebildet werden, die das Überleben der Zelle gewährleisten. Durch die Induktion eines G1-Arrestes der Zellen durch Palbociclib kommt es zu einer Synchronisierung der Zellen. Gleichzeitig kommt es zu einer Veränderung des Tumorzellmetabolismus. Da die Zelle nicht mehr in der Lage ist in die nächste Phase des Zellzyklus zu gelangen, ist sie auch nicht in der Lage wichtige Proteine zu synthetisieren, die für eine adäquate Zellintegrität notwendig sind. Tumorzellen benötigen ganz spezifische Voraussetzungen für ihr Wachstum. Zum einen eine erhöhte Energiebereitstellung in Form von ATP. Zum anderen die Anpassung an veränderte PH-Werte oder auch gegenüber vermehrt anfallende freie Radikale durch eine anaerobe Stoffwechsellage

(Cairns et al., 2011). Sind die Zellen nun nicht in der Lage sich diesen Anforderungen durch einen G1-Arrest anzupassen, könnte dies zu einer Wirkverstärkung diverser anderer Therapeutika führen. So haben Huang et al. Myelom-Zellen initial mit 0,5 μ M Palbociclib behandelt, um zwischen 4 und 24 Stunden danach Bortezomib hinzuzugeben. Sie konnten die Zahl der viablen Zellen stark senken bzw. die Sensitivität auf Bortezomib drastisch erhöhen (Huang et al., 2012). Auch klinisch hat sich die Induktion eines G1-Arrestes mit Palbociclib und darauffolgender Gabe eines Zytostatikums als effektiv erwiesen. In einer Phase II Studie wurde Palbociclib mit Letrozol bei Patienten mit ER+/HER2- -Brustkrebs eingesetzt. Dies führte zu einer PFS von 26,1 Monaten im Vergleich zur Monotherapie mit Letrozol von 7,5 Monaten (Finn et al., 2012).

Dieser Sachverhalt wurde auch in der vorliegenden Arbeit untersucht. Dabei wurden die drei MCL-Zelllinien initial mit Palbociclib behandelt und nach 24 Stunden zusätzlich mit Idelalisib über weitere 72 Stunden behandelt. Die zeitversetzte Gabe hat sich der gleichzeitigen Inkubation hier allerdings nicht als überlegen erwiesen. Bei gleichzeitiger Gabe waren nach 72 Stunden noch zwischen 30% und 57% der Zellen viabel. Bei zeitversetzter Gabe hat sich eine Reduktion zwischen 33% und 57% an viablen Zellen ergeben.

Auch im Verhältnis zur Ausgangszelldichte konnte die zeitversetzte Gabe von Palbociclib und Idelalisib keinen größeren proliferationshemmenden Effekt aufweisen. Das Wachstum der Zellen zeigte sich hier ebenfalls kontinuierlich ansteigend, um nach 72 Stunden bei allen drei Zelllinien ein Wachstum zu erreichen, welches etwa 100% über dem Ergebnis der gleichzeitigen Gabe lag. Hierbei wurde berücksichtigt, dass die Zellen hier insgesamt über einen Zeitraum von 96 Stunden behandelt wurden.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Zeitpunkt der Ausgangszelldichte die Zugabe von Idelalisib gewählt.

Somit konnte der Effekt einer vorherigen Sensibilisierung der MCL-Zelllinien durch einen G1-Arrest mittels Palbociclib in der vorliegenden Arbeit nicht erzielt werden. Chiron et al. hingegen haben in einem entsprechenden Versuchsaufbau ein signifikant verbessertes Ansprechen von Idelalisib auf die MCL-Zelllinien durch vorhergehende G1-Arrest-Induktion mittels Palbociclib zeigen können. Palbociclib wurde hierbei in einer Dosis von 0,5 μ M verwendet und ebenfalls 24 Stunden vor der Gabe von

Idelalisib (5 μ M) gegeben. Es wird hier eine Zunahme des PI3K-Inhibitors PIK3IP1 beschrieben, der in der G1-Phase vermehrt induziert wird. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die verwendete Dosierung von Palbociclib darstellen. Chiron et al. haben 500 nM verwendet eine achtfach höhere Dosierung als in der vorliegenden Arbeit (Chiron et al. 2013).

6.2.4 Apoptoseinduktion der Mono- und Kombinationstherapie

Die Apoptose als natürliche Induktion des programmierten Zelltodes ist ebenfalls häufig beim MCL dysreguliert. Durch entsprechende Überexpression von antiapoptotischen Proteinen bzw. auch durch einen Verlust von proapoptotischen Proteinen kommt es durch mangelnde Apoptoseinduktion zu einem Überlebensvorteil der Zelle (Jares et al., 2008). Dementsprechend war auch die Untersuchung hinsichtlich einer etwaigen Apoptoseinduktion in Mono- oder Kombinationstherapie im MCL *in vitro* von Interesse.

In den untersuchten Zelllinien konnte durch die Behandlung mit den Therapeutika keine Apoptose induziert werden. Unabhängig des verwendeten Therapeutikums, in Mono- oder auch in Kombinationstherapie, gab es keine Verschiebung der Viabilität. Durch seine spezifische Inhibition von CDK4/6 führte Palbociclib in Monotherapie zu keiner Abnahme der Viabilität im Apoptoseassay. Dies korrelierte mit der Analyse des Zellzyklus. Hier zeigten sich ebenfalls keine Zellen im Sub-G1-Bereich, die als apoptotisch angesehen werden. Zu diesem Ergebnis kamen auch Marzec et al. die keine Apoptoseinduktion in MCL-Zellen durch Palbociclib gefunden haben. Ebenso hat Ibrutinib keine Zunahme der Apoptose gezeigt. Das nach 24 Stunden angefertigte Apoptoseassay zeigte keine Verschiebung der Viabilität in einen apoptotischen Bereich, ebenso war dies nicht in der Zellzyklusanalyse zu vernehmen. Dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen von Cinar et al., die eine signifikante Zunahme an nicht viablen Zellen in den MCL-Zelllinien Mino-1 und Jeko-1 durch die Behandlung mit Ibrutinib zeigen konnten. Allerdings wurden die Zellen hier für 72 Stunden mit 10-20 μ M inkubiert. Mino-1 zeigte hier nach 72 Stunden mit einer verwendeten Dosierung von 10 μ M eine Zunahme von 15% apoptotischer Zellen. Mit der höchsten Dosis von 20 μ M konnte

eine Zunahme der Apoptose von 37% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erreicht werden (Cinar et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen allerdings nur für 24 Stunden mit Ibrutinib inkubiert und auch in einer niedrigeren Dosierung von 5 μM . Dies hat gezeigt, dass für eine Apoptoseinduktion eine längere Inkubationsdauer oder auch eine höhere Dosierung von Ibrutinib notwendig ist. Auch die Kombinationstherapie mit Palbociclib und Ibrutinib hat zu keiner Apoptose geführt. Somit konnte Palbociclib die mögliche apoptotische Wirkung von Ibrutinib weder verstärken noch die Zellen für die Apoptose sensibilisieren.

Auch die Monotherapie mit Idelalisib hat zu keiner Apoptose geführt. Diese Ergebnisse konnten auch Chiron et al. in ihrer Arbeit bestätigen. Allerdings zeigte sich hier in der Kombination von Palbociclib (0,5 μM) und Idelalisib (0-5 μM) eine stärkere Zunahme der Apoptose, nach 90-stündiger Inkubation mit den beiden Therapeutika (Chiron et al., 2013). Dies deckt sich an dieser Stelle nicht mit Chiron et al., allerdings ist zu berücksichtigen, dass in der vorliegenden Arbeit die Zellen nur für 24 Stunden inkubiert wurden. Das bedeutet, dass die Kombinationstherapie mit Palbociclib und einem der anderen *small molecules* zu einer verstärkten Apoptose führen kann, allerdings hängt dies in hohem Maße davon ab wie lange die Zellen inkubiert werden und mit welcher Dosierung. Hierbei hat sich gezeigt, dass Ibrutinib eher in höheren Dosierungen starke apoptotische Aktivität zeigt, wohingegen die Wirksamkeit von Idelalisib eher einer längeren Inkubation bedarf.

6.2.5 Analyse des Fraction of Product

Die Kombinationsanalyse von Palbociclib mit Ibrutinib und mit Idelalisib hat in der Berechnung des Fraction of Product fast durchgehend einen Antagonismus gezeigt. Nur Mino-1 hat unter der Behandlung mit Palbociclib und Idelalisib nach 24 Stunden einen Additivismus gezeigt. Nach weiteren 24 Stunden war hier allerdings schon ein Antagonismus zu verzeichnen. Dieser Antagonismus hat sich bei beiden Kombinationsanalysen gezeigt und über die Zeit zugenommen. Es ist bei der Fraction of Product Methode allerdings zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse verfälscht sein können, wenn die Dosis-Wirkungskurve einen sigmoidalen Verlauf nimmt. Nur bei

einem hyperbolen Verlauf und wenn beide verwendeten Therapeutika einen nicht-unabhängigen Wirkmechanismus haben, kann die Fraction of Product Methode uneingeschränkt eingesetzt werden (Chou et al., 1984). In der vorliegenden Arbeit konnten die Dosis-Wirkungskurven nur eingeschränkt erstellt werden, so dass das Profil ebendieser für eine signifikante Aussage hinsichtlich des Fraction of Produkt fraglich ist. Allerdings kann auch schon durch die Viabilitätsanalysen eine Tendenz gesehen werden, dass die Kombinationstherapien in der hier vorliegenden Arbeit keine signifikante Wirkverstärkung gezeigt haben. Die Kombination von Palbociclib mit Ibrutinib konnte zumindest bei der MCL-Zelllinie Jeko-1 einen leicht stärkeren Effekt in der Proliferationshemmung zeigen.

6.2.6 Einfluss des Mikroumfelds auf das MCL

Die Beurteilung der Wirksamkeit der Therapeutika ist bei Experimenten *in vitro* begrenzt. *In vivo* wirken verschiedene Faktoren zusätzlich auf die Tumorzellen, im Speziellen auch auf das Mantelzell-Lymphom, die den Zellen einen Vorteil hinsichtlich Wachstum und Überleben verschaffen.

Es ist bekannt, dass das Mikroumfeld für MCL von großer Relevanz ist. Autokrine oder exokrine Synthese von IL-6 führt zu einem Wachstumsstimulus und weiterhin zu einem Überlebensvorteil für die MCL-Zellen. MCL-Zellen kommen häufig in Lymphknoten, Knochenmark oder auch im Gastrointestinaltrakt vor. Die Stromazellen des Knochenmarks synthetisieren IL-6, so dass das MCL hier einen Wachstumsvorteil erhält (Zhang et al., 2012). Ein Herauslösen des MCL aus seinem Mikroumfeld könnte hier ein weiterer Therapieansatz sein. Rosich et al. konnten die Überlegenheit einer dualen Inhibition mit dem PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235 gegenüber einer *single-target*-Therapie mit dem mTOR-Inhibitor Everolimus und dem Pan-PI3K-Inhibitor NVP-BKM120 zeigen. NVP-BEZ235 inhibiert potent sowohl PI3K, mTORC1 als auch mTORC2, so dass auch die Phosphorylierung von Metaboliten des PI3K-AKT-mTOR-Signalweges stark herabreguliert wurde und zusätzlich die Angiogenese, Migration und Tumorinvasivität vermindert wurde. Die duale Inhibition zeigte hier als einziges eine Unterbrechung der IL-4 und der IL-6/STAT3-Signalkaskade (Rosich et al., 2014). Diese

dualen Therapieansätze haben de Rooij et al. mittels gleichzeitiger Gabe von Ibrutinib und Idelalisib wiederholt und gezeigt, dass sich dadurch die Zellmobilität von MCL und CLL erhöhen lässt. Durch die Integrin-vermittelte Adhäsionsfähigkeit der Zellen verbleiben die Zellen in ihrer lymphatischen Umgebung, die ihnen Schutz und Wachstumsvorteile bietet. Mittels Gabe von Ibrutinib wird dieser über den B-Zell-Rezeptor und über Chemokine vermittelte Mechanismus unterbunden, so dass die Zellen eine erhöhte Mobilität erhalten. Durch diese mangelhafte Integration kommt es zur Auschwemmung und Zirkulation der Zellen in die Blutgefäße. Letztendlich führt dies wiederum zu einer Regression der Tumormasse. Durch die Hinzunahme von Idelalisib konnte dieser Effekt zum einen verstärkt werden und zum anderen die Resistenzrate gegenüber Ibrutinib gesenkt werden, da durch die gleichzeitige Gabe von Ibrutinib und Idelalisib diese BCR-vermittelte Integrin-Adhäsion an zwei unterschiedlichen Punkten inhibiert wird und somit einer etwaigen Mutation und damit Resistenz besser entgegen steht (de Rooij et al., 2015).

Durch die Sensibilisierung der Mantelzell-Lymphom-Zellen mittels Induktion eines G1-Arrestes konnte die Wirksamkeit sowohl von Ibrutinib als auch von Idelalisib erhöht werden (Chiron et al., 2013; 2014). Fasst man die Beobachtungen von Chiron et al., de Rooij et al. und auch Rosich et al. zusammen, könnte durch einen initialen G1-Arrest mittels Palbociclib und anschließender dualen Therapie mit Ibrutinib und Idelalisib diese Kombination eine vielversprechende und potente Therapie gegen das MCL ergeben. Diese Ergebnisse konnten in unseren Experimenten allerdings nicht bestätigt werden.

In weiteren Experimenten muss nun die Wirksamkeit von Palbociclib und Ibrutinib bzw. Idelalisib weiter untersucht werden, um noch genauer die Wirkungsweise der verwendeten Substanzen zu verstehen und dadurch eine optimale Dosierung und Behandlungszeit herausfinden zu können, bevor als weiterer Schritt die Auswirkungen der Kombinationstherapien in klinischen Studien zu untersuchen sind. Die Ergebnisse unserer Experimente zeigen, wie durch einen sinnvollen präklinischen Ansatz die weitere klinische Erforschung des MCL gezielt voran getrieben werden kann.

7. Zusammenfassung

Das Mantelzell-Lymphom ist charakterisiert durch die Chromosomentranslokation t(11;14)(q13;q32), wodurch es zu einer Überexpression von Cyclin D1 kommt. Es geht von allen niedrig malignen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen mit einer sehr schlechten Prognosen einher, so dass das mittlere Überleben nur 3 bis 5 Jahren beträgt. Neue effektive und zielgerichtete Therapieformen sind daher dringend notwendig, um die Prognose des MCL zu verbessern.

Wichtiger Bestandteil der Arbeit war die Charakterisierung von Palbociclib, Ibrutinib und Idelalisib in Mono- und Kombinationstherapie in der Behandlung von sechs MCL-Zelllinien *in vitro*. Hierzu wurden die Zellen hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens mittels automatisierter Vi-Cell-Analyse untersucht. Weiteres Ziel war die Untersuchung des Zellzyklusprofils und der Viabilitätsanalyse mittels Apoptoseassay.

Palbociclib zeigte in fast allen Zelllinien eine dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung. Schon in niedriger Dosierung konnte initial nach 48 und 72 Stunden eine sehr starke Reduktion der Zellviabilität erreicht werden. Dies ging einher mit einer signifikanten Verschiebung des Zellzyklus hin zu einem G1-Arrest bei gleichzeitigem Rückgang der S-Phase. Eine Apoptose konnte in keiner Zelllinie induziert werden. Ibrutinib und Idelalisib konnten ebenfalls eine zeitabhängige Proliferationshemmung erzielen. Zellzyklus und Apoptose wurden nur geringfügig verändert. In den Kombinationstherapien konnte nur ein geringer Zugewinn in der Zellzahlreduktion erreicht werden, wobei sich hier die Kombination mit Ibrutinib als wirksamer erwies. In beiden Kombinationen zeigte sich durchgehend ein Antagonismus, der im zeitlichen Verlauf zugenommen hatte.

Durch die *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Palbociclib eine starke Wirkung gegenüber den MCL-Zelllinien gezeigt hat. In den Kombinationstherapien konnte die Wirksamkeit jedoch nur gering verbessert werden. Daher muss zunächst in weiteren *in vitro* und *in vivo* Experimenten die Wirksamkeit von Palbociclib in Kombinationstherapie mit Ibrutinib und Idelalisib untersucht werden, bevor ein entsprechender klinischer Therapieansatz in Studien geprüft werden sollte.

8. Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	Eukaryotischer Elongationsfaktor 4E Bindungsprotein 1
AKT	Proteinkinase B
ARF	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor
ASCT	Stem cell transplantation
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
B-ALL	B-Akute lymphatische Leukämie
B-R	Bendamustin, Rituximab
BAD	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
BCL	B-Cell-Lymphoma
BCR	B-cell receptor
BCRA1	Breast Cancer 1
BID	BH3 interacting-domain death agonist
BLNK	B cell linker protein
BTK	Bruton's tyrosine kinase
CDK	Cyclin dependent kinase
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CHK	Checkpoint Kinase
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin, Prednison
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CR	Complete remission
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E2F	E2 Factor
EIF-4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FKHR-L1	FOXO3, Forkhead-Box-Protein 03
FLT-SUV	Fluorothymidine-Standardized uptake value
FMC	Fludarabin, Cyclophosphamid, Mitoxantron
GSK-3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
GLSG	German Low-Grade Lymphoma Study Group

Abkürzungsverzeichnis

HDT	Hochdosis-Therapie
HyperVAD	Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin, Decadron, Cytarabin, Methotrexat
IGHV	Immunoglobulin heavy chain variable
IRS1	Insulin receptor substrate 1
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
kb	Kilobasen
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCL	Mantelzell-Lymphom
MDM2	Murine-double-Minute-2
MIPI	Mantle cell lymphoma international prognostic Index
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
mTORC	Mammalian Target of Rapamycin Complex
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B-cells
ORR	Objective response rate
PFS	Progression free survival
PI3K	Phosphoinositid-3 Kinasen
PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
R	Rituximab
RB	Retinoblastom-Protein
DHAP	Dexamethason, Cytarabin, Cisplatin
FC	Fludarabin, Cyclophosphamid
MCP	Mitoxantron, Chlorambucil, Prednison
REAL	Revised European American Lymphoma
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
Syk	Spleen tyrosine kinase
TK1	Thymidine kinase 1
TNF β	Tumor necrosis factor β
TTF	Time to treatment failure
WHO	World Health Organization

9. Literaturverzeichnis

Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib(PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. J Clin Oncol 2013;31(1):88-94

Aleem E, Arceci RJ. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. Front Cell Dev Biol. 2015; 3:(16)

Amin HM, McDonnell TJ, Medeiros LJ, et al. Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines. Arch Pathol Lab Med. 2003;127(4):424-31

Bernard M, Tsang RW, Le LW, et al. Limited-stage mantle cell lymphoma: treatment outcomes at the Princess Margaret Hospital. Leuk Lymphoma. 2013;54(2):261-7

Bertoni F, Zucca E, Cavalli F, Mantle cell lymphoma. Curr Opin Hematol. 2004, 11(6):411-8

Bertoni F, Ponzoni M, The cellular origin of mantle cell lymphoma. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(10):1747-53

Cairns RA, Harris IS, Mak TW, Regulation of cancer cell metabolism. Nat Rev Cancer. 2011;11(2):85-95

Camacho E, Hernandez L, Hernandez S, et al. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. Blood. 2002;99(1):238-44

Camacho FI, Garcia JF, Cigudosa JC, et al. Aberrant Bcl6 protein expression in mantle cell lymphoma. Am J Surg Pathol. 2004;28(8):1051-6

Cantley LC. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*. 2002; 296:1655-57

Carracedo A, Pandolfi PP, The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*. 2008;27(41):5527-41

Cinar M, Hamedani F, Mo Z, et al. Bruton tyrosine kinase is commonly overexpressed in mantle cell lymphoma and its attenuation by Ibrutinib induces apoptosis. *Leuk Res*. 2013;37(10):1271-7

Chiron D, Martin P, et al. Induction of prolonged early G1 arrest by CDK4/CDK6 inhibition reprograms lymphoma cells for durable PI3K δ inhibition through PIK3IP1. *Cell Cycle*. 2013;12(12):1892-900

Chiron D, Di Liberto M, Martin P, et al. Cell-Cycle reprogramming for PI3K Inhibition overrides relapse-specific C481S BTK mutation revealed by longitudinal functional genomics in mantle cell lymphoma. *Cancer Discov*. 2014;4(9):1022-35

Choi MY, Kipps TJ. Inhibitors of B-cell receptor signaling for patients with B-cell malignancies. *Cancer J*. 2012;18(5); 404-10

Chou TC, Talalay P. Quantitive analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzym Regulation*. 22(C) 27-55 1984

Deshpande A, Pastore A, Deshpande AJ, et al. 3'UTR mediated regulation of the cyclin D1 proto-oncogene. *Cell Cycle* 2009;8(21):3592-600

de Rooij ME, Kuli A, Kater AP, et al. Ibrutinib and Idelalisib synergistically target BCR-controlled adhesion in MCL and CLL: a rationale for combination therapy. *Blood*. 2015;125(14):2306-9

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF et al. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & Dev.* 1998;12:3499-3511

Diehl JA. Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther.* 2002;1(3):226-31

Doorduijn JK, Kluin-Nelemans HC. Management of mantle cell lymphoma in the elderly patient. *Clin Interv Aging.* 2013;8:1229-36

Drexler HG, Macleod RA. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of mantle cell lymphoma. *Leuk Res.* 2002;26(9):781-7

Dreyling M. European Mantle Cell Lymphoma Network. Mantle cell lymphoma: biology, clinical presentation, and therapeutic approaches. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2014;34:191-8

Dreyling M, Geisler C, Hermine H, et al. Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014;25(3):83-92

Dreyling M, Jurczak W, Jerkeman M, et al. Ibrutinib versus temsirolimus in patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: an international, randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet.* 2016;387(10020):770-778

Estrov Z, Talpaz M, Ku S, et al. Z-138: a new mature B-cell acute lymphoblastic leukemia cell line from a patient with transformed chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 1998;22(4):341-53

Fernandez V, Hartmann E, Ott G, et al. Pathogenesis of mantle cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol.* 2005;23(26):6364-9

Ferrer A, Bosch F, Villamor N, et al. Central nervous system involvement in mantle cell lymphoma. *Ann Oncol.* 2008;19(1):135-41

Finn RS, Crown JP, Boer K, et al. Results of a randomized phase 2 study of PD 0332991, a cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 inhibitor, in combination with letrozole vs letrozole alone for first-line treatment of ER+/HER2- advanced breast cancer (BC). *Cancer Res.* 2012;72(24 Suppl):S1-S6

Franco J, Witkiewicz AK, Knudsen ES. CDK 4/6 inhibitors have potent activity in combination with pathway selective therapeutic agents in models of pancreatic cancer. *Oncotarget.* 2014;5(15):6512-25

Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 2004;30(2):193-204

Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67:481-507.

Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, et al., Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 2004;3(11):1427-37

Fu K, Weisenburger DD, Greiner, TC, et al. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood.* 2005;106(13):4315-21.

Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, et al. Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group. *Blood.* 2008;112(7):2687-93

Gesk S, Klapper W, Martin-Subero JJ, et al. A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood*. 2006;108(3):1109-10

Ghielmini M, Zucca E. How I treat mantle cell lymphoma. *Blood*. 2009;114(8):1469-76

Gill S, Seymour JF. What is the real risk of central nervous system involvement in mantle cell lymphoma ? *Leuk Lymphoma*. 2008;49(12):2237-9

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev*. 2001;15(7):807-26

Haritunians T, Mori A, O'Kelly J, et al. Antiproliferative activity of RAD001 (everolimus) as a single agent and combined with other agents in mantle cell lymphoma. *Leukemia*. 2007;21(2):333-9

Hermine O, Hoster E, Walewski J, et al. Alternating courses of 3x CHOP and 3x DHAP plus rituximab followed by a high dose ARA-C containing myeloablative regimen and autologous stem cell transplantation (ASCT) is superior to 6 courses CHOP plus rituximab followed by myeloablative radiochemotherapy and ASCT in mantle cell lymphoma: results of the MCL Younger Trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network (MCL net) *Blood*. (ASH Annual Meeting Abstracts) 2010 116: Abstract 110

Hernandez L, Fest T, Cazorla M, et al. p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphoma. *Blood*. 1996;87(8):3351-9

Herrera AF, Jacobsen ED. Ibrutinib for the treatment of mantle cell lymphoma *Clin Cancer Res*. 2014;20(21):5365-71

Herrmann A, Hoster E, Zwingers T, et al. Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(4):511-8. >

Hitz F, Bargetzi M, Cogliatti S, et al. Diagnosis and treatment of mantle cell lymphoma
Swiss Med Wkly. 2013;143:w13868

Hoffman DG, Tucker SJ, Emmanoulides C, et al. CD8-positive mantle cell lymphoma: a
report of two cases. Am J Clin Pathol. 1998;109(6): 689-94

Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor
PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease
and B-cell malignancy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United
States of America. 2010;107(29):13075-13080.

Hoster E, Dreyling M, Klapper W, et al. A new prognostic index (MIPI) für patients
with advanced-staged mantle cell lymphoma. Blood. 2008; 111(2):558-65

Hoster E, Unterhalt M, Wörmann B, et al. The Addition of rituximab to first-line
chemotherapy (R-CHOP) results in superior response rates, time to treatment failure
and response duration in patients with advanced stage mantle cell lymphoma: long term
results of a randomized GLSG Trial. Blood. (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008 112:
Abstract 3049

Huang X, Di Liberto M, Jayabalan D, et al. Prolonged early G1-arrest by selective
CDK4/CDK6 inhibition sensitizes myeloma cells to cytotoxic killing through cell cycle
– coupled loss of IRF4. Blood. 2012;120(5): 1095-1106

Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II:. Cyclin D and CDK inhibitors come of age.
Cell. 1994;79(4):573-82

Hutter G, Scheubner M, Zimmermann Y, et al. Differential effect of epigenetic
alterations and genomic deletions of CDK inhibitors [p16(INK4a), p15(INK4b),
p14(ARF)] in mantle cell lymphoma. Genes, Chromosomes & Cancer 2006;45(2):203-
10

Inwards JD, Witzig TE. Initial therapy of mantle cell lymphoma. Ther Adv Hematol. 2011;2(6):381-392

Jares P, Campo E. Advances in the understanding of mantle cell lymphoma 2008 Br J Haematol. 2008;142(2):149-65

Katsumi Y, Iehara T, Miyachi M, et al. Sensitivity of malignant Rhabdoid tumor cell lines to PD 0332991 is inversely correlated with p16 expression. Biochem Biophys Res Commun. 2011;413(1): 62-8

Kahl BS, Spurgeon SE, Furman RR, et al. A phase 1 study of the PI3K δ inhibitor idelalisib in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma (MCL). Blood. 2014;123(22):3398-405

Kienle D, Kröber A, Katzenberger T, et al. VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. Blood 2003;102(8):3003-3009.

Klapper W, Hoster E, Determann O, et al. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma - consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. J Hematop. 2009;2(2):103-11

Klier M, Anastasov N, Hermann A, et al. Specific lentiviral shRNA-mediated knockdown of cyclin D1 in mantle cell lymphoma has minimal effects on cell survival and reveals a regulatory circuit with cyclin D2. Leukemia. 2008;22(11):2097-105

Kluin-Nelemans HC, Hoster E, Hermine O, et al. Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. N Engl J Med. 2012;367:520-31

Kouroukis T, Belch A, Crump M, et al. 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. 2003;21(9):1740-5

Lai R, McDonnell TJ, O'Connor SL, et al. Establishment of a new mantle cell lymphoma cell line, Mino. *Leuk Res.* 2002;26(9):849-55

Leitch HA, Gascoyne RD, Chhanabhai M, et al. Limited-stage mantle cell lymphoma. *Ann Oncol.* 2003;14(10):1555-61

Lennert K, Stein H, Kaiserling E. Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Br J Cancer Suppl.* 1975;2:29-431:29-43

Lenz G, Dreyling M, Hoster E, et al. Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of German Low Grade Lymphoma Study group (GLSG). *J Clin Oncol.* 2005;23(9):1984-92

Leonard JP, LaCasce AS, Smith MR, et al. Selective CDK4/6 inhibition with tumor responses by PD0332991 in patients with mantle cell lymphoma. *Blood.* 2012;119(20):4597-607

Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3KPKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle.* 2003;2(4):339-45

Lu F, Gladden AB, Diehl JA. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. *Cancer Res.* 2003;63(21):7056-61

Majlis A, Pugh W, Rodriguez M, et al. Mantle cell lymphoma: correlation of clinical outcome and biologic features with three histologic variants. *J Clin Oncol.* 1997; 15(4):1664-71

Malumbres M, Sotillo R, Santamaria D, et al. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell.* 2004;118(4):493-504

Medeiros LJ, Estrov Z, Rassidikis GZ. Z-138 cell line was derived from a patient with blastoid variant mantle cell lymphoma. *Leuk Res.* 2006;30(4):497-501

Mohamed AJ, Yu L, Bäckesjö CM, et al. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol Rev.* 2009;228:59-73.

Monni O, Zhu Y, Franssila K, et al. Molecular characterization of deletion at 11q22.1-23.3 in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol.* 1999;104(4):665-71

Mozos A, Royo C, Hartmann E, et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica.* 2009;94(11):1555-62

Noel MS, Friedberg JW, Barr PM. Novel agents in mantle cell lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2012;25(2):191-200

Orchard J, Garand R, Davis Z, et al. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood.* 2003;101(12):4975-81

Pan Z, Scheerens H, Li SJ, et al. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem.* 2007;2(1):58-61

Parker BW, Kaur G, Nieves-Neira W, et al. Early induction of apoptosis in hematopoietic cell lines after exposure to flavopiridol. *Blood.* 1998;91(2):458-65.

Peponi E, Drakos E, Reyes G, et al. Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma. *Am J Pathol.* 2006;169(6):2171-80

Perez-Galan P, Dryeling M, Wiestner A, Mantle Cell Lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*. 2011;117(1):26-38

Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, et al. Deletion and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood*. 1997;89(1):272-80

Pinyol M, Cobo F, Bea S, et al. p16^{INK4a} gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-hodgkin's lymphomas. *Blood*. 1998;91(8):2977-2984

Rizatti EG, Falcao RP, Panepucci RA, et al. Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFbeta signalling pathways. *Br J Haematol*. 2005;130(4):516-26

Rolli V, Gallwitz M, Wossning T, et al. Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol Cell*. 2002;10(5):1057-69

Rosenwald IB, Lazaris-Karatzas A, Sonenberg N, et al. Elevated levels of cyclin D1 protein in response to increased expression of eukaryotic initiation factor 4E. *Mol Cell Biol*. 1993;13(12):7358-63

Rosich L, Montraveta A, Xargay-Torrent S, et al. Dual PI3K/mTOR inhibition is required to effectively impair microenvironment survival signals in mantle cell lymphoma. *Oncotarget*. 2014;5(16):6788-800

Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S, et al. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood*. 2006;108(5):1668-76

Rummel MJ, Niederle N, Maschmeyer G, et al. 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.

The Lancet. 2013;381(9873):1203-1210

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature. 1993; 366(6456):704-7

Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. Cancer Cell. 2002;2(2):103-12

Stegh AH. Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy - the promises, challenges and perils. Expert Opin Ther Targets. 2012;16(1):67-83 nur online nicht ausgedruckt

Swerdlow SH, Williams ME. From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades. Hum Pathol 2002;33(1):7-20

Swerdlow SH, Campo E, Seto M, Muller-Hermelink HK. Mantle cell lymphoma. In: Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al. eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France : IARC; 2008:229-232

Tiemann M, Schrader C, Klapper W, et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. Br J Haematol. 2005;131(1):29-38

Tucker CA, Bebb G, Klasa RJ, et al., Four human t(11;14)(q13;q32)-containing cell lines having classic and variant features of Mantle Cell Lymphoma. Leuk Res. 2006;30(4):449-57

Vaandrager JW, Schuurin E, Zwikstra E, et al. Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. *Blood*. 1996; 88,1177-1182

Wang ML, Rule S, Martin P, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2013;369:507-16

Wang Y, Ma S. Risk Factors for Etiology and Prognosis of Mantle Cell Lymphoma. *Expert Rev Hematol*. 2014;7(2):233-43

Webb J. Effect of more than one inhibitor. *Enzyme and metabolic inhibitors* 1963;1:66-79.

Welzel N, Le T, Marculescu R, et al. Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. *Cancer Res*. 2001;61(4):1629-36

Witzens-Harig M, Hess G, Atta J, et al. Current treatment of mantle cell lymphoma: results of a national survey and consensus meeting. *Ann Hematol*. 2012;91(11):1765-72

Witzig RE, Kaufmann SH. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin pathway in hematologic malignancies. *Curr Treat Options Oncol*. 2006;7(4):285-94

Yang Q, Modi P, Newcomb T, et al. Idelalisib: First-in-Class PI3K Delta Inhibitor for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia, Small Lymphocytic Leukemia, and Follicular Lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2015;21(7):1537-42

Zamo A, Ott G, Katzenberger T, et al. Establishment of the MAVER-1 cell line, a model for leukemic and aggressive mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2006;91(1):40-7

Zhang L, Yang J, Qian J, et al. Role of the microenvironment in mantle cell lymphoma: IL-6 is an important survival factor for the tumor cells. *Blood*. 2012;120(18):3783-92

Zucca E, Stein H, Coiffier B. European Lymphoma Task Force (ELTF): report of the workshop on Mantle Cell Lymphoma (MCL). *Ann Oncol*. 1994;5(6):507-11.

10. Danksagungen

Ich möchte Prof. Dr. med. Martin Dreyling für das interessante Thema der Arbeit, die Möglichkeit sein Labor für die Durchführung der Experimente zu nutzen und nicht zuletzt für die durchweg freundlich und kompetente Unterstützung danken.

Weiterhin möchte ich großen Dank gegenüber meiner Betreuerin Dr. med. Anna Zoellner aussprechen, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und auch in schwierigen Zeiten eine große Hilfe war.

Großer Dank gilt auch Dr. Grit Hutter und Frau Yvonne Zimmermann, die mich mit viel Geduld und Fachkenntnis in die Zellkultur eingewiesen haben und bei Fragen immer ein offenes Ohr hatten.

Eidesstattliche Versicherung

Dietzfelbinger, Roland

Name, Vorname

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

Gezielte molekulare Therapie des Mantelzell-Lymphoms

—
In Vitro Wirksamkeit von
Palbociclib, Ibrutinib und Idelalisib
in
Mono- und Kombinationstherapie

selbstständig 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.

Nürnberg, den 28.12.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand