

---

# **Therapie des Mantelzell-Lymphoms**

**In vitro Analysen von Inhibitoren des  
B-Zell-Rezeptor-Signalweges  
zur Behandlung des Mantelzell-Lymphoms**

**Tina Lautenschläger  
2018**

---





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

**In vitro Analysen von Inhibitoren des  
B-Zell-Rezeptor-Signalweges  
zur Behandlung des Mantelzell-Lymphoms**

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

**vorgelegt von  
Tina Lautenschläger  
aus  
Friedrichshafen  
2018**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Dreyling

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Edgar Meisl

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Anna Zöllner

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

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2018



**Eidesstattliche Versicherung**

Lautenschläger, Tina

---

Name, Vorname

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

**In vitro Analysen von Inhibitoren des B-Zell-Rezeptor-Signalweges zur  
Behandlung des Mantelzell-Lymphoms**

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 vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

**Leipzig, 28.08.2018**

Ort, Datum

---

**Tina Lautenschläger**

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

## **Widmung**

Für meine Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben und mir den Mut geben die Herausforderung des Studiums der Humanmedizin anzunehmen.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>WIDMUNG</b>	<b>6</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>7</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>10</b>
1.1 DAS MANTELZELL-LYMPHOM	10
1.1.1 Epidemiologie, Klinik und Verlauf	10
1.1.2 Histomorphologie	11
1.1.3 Immunphänotyp	13
1.1.4 Molekulare Pathogenese und Zytogenetik	13
1.1.4.1 <i>Der B-Zell-Rezeptor-Signalweg</i>	16
1.1.5 Microenvironment	18
1.1.6 Therapie	20
1.1.6.1 <i>First-Line-Therapie</i>	20
1.1.6.2 <i>Therapie bei Rezidiven</i>	21
1.2 TARGETED THERAPY – MOLEKULAR GEZIELTE THERAPIE	22
1.2.1 Ibrutinib	23
1.2.2 Idelalisib	24
1.2.3 Temsirolimus	24
<b>2 ZIELSETZUNGEN DIESER ARBEIT</b>	<b>26</b>
<b>3 MATERIAL</b>	<b>27</b>
3.1 REAGENZIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER	27
3.2 THERAPEUTIKA	28
3.2.1 Inhibitoren	28
3.2.2 Zytostatika	28
3.3 VERWENDETE GERÄTE	29
<b>4 METHODIK</b>	<b>30</b>
4.1 ZELLKULTUR	30
4.1.1 Verwendete Zelllinien	30
4.1.2 Bedingungen und Durchführung der Zellkultivierung	30
4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	31
4.2 FEEDER LAYER	31
4.2.1 Kultivierung und Bestrahlung	32
4.3 ZELLQUANTIFIZERUNG	33
4.3.1 Trypanblau-Ausschlusstest	33
4.3.2 Vi-CELL Zellzählgerät	34

4.3.3	Versuchsaufbau	34
4.3.4	Fraction of Product	35
4.4	FACS-ANALYSEN	36
4.4.1	Apoptose Detektion mit Annexin V-FITC- und Propidiumiodid-Färbung	36
4.4.2	Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid Färbung	38
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
5.1	IBRUTINIB	40
5.1.1	Dosisfindung	40
5.1.2	Wachstumskurven bei 10 nM	41
5.1.3	Kombinationsassays	42
5.1.3.1	<i>Kombinations-Therapie</i>	42
5.1.3.2	<i>Kombinations-Therapie ohne und mit Feeder Layer</i>	45
5.1.4	FACS-Analysen	49
5.1.4.1	Apoptose	49
5.1.4.2	<i>Änderungen im Zellzyklusprofil</i>	50
5.2	IDEALISIB	52
5.2.1	Dosisfindung	52
5.2.2	Wachstumskurven bei 5 µM	52
5.2.3	Kombinationsassays	54
5.2.3.1	<i>Kombinations-Therapie</i>	54
5.2.3.2	<i>Kombinations-Therapie ohne und mit Feeder Layer</i>	56
5.2.4	FACS-Analysen	60
5.2.4.1	Apoptose	60
5.2.4.2	<i>Änderungen im Zellzyklusprofil</i>	61
5.3	TEMSIROLIMUS	64
5.3.1	Dosisfindung	64
5.3.2	Wachstumskurven bei 10 nM	64
5.3.3	Kombinationsassays	65
5.3.3.1	<i>Kombinations-Therapie ohne Feeder Layer</i>	65
5.3.3.2	<i>Kombinations-Therapie ohne und mit Feeder Layer</i>	68
5.3.4	FACS-Analysen	71
5.3.4.1	Apoptose	71
5.3.4.2	<i>Änderungen im Zellzyklusprofil</i>	72
5.4	KOMBINATIONS-THERAPIE DER INHIBTOREN	75
5.4.1	Kombinationassays	75
5.4.1.1	<i>Kombinations-Therapie ohne Feeder Layer</i>	75
5.4.1.2	<i>Kombinations-Therapie ohne und mit Feeder Layer</i>	77
5.4.2	FACS-Analysen	80
5.4.2.1	Apoptose	80
5.4.2.2	<i>Änderungen im Zellzyklusprofil</i>	80

<b>6 DISKUSSION</b>	<b>83</b>
6.1 IBRUTINIB	83
6.2 ZYTOSTATIKA	84
6.2.1 Kombinations-Therapie mit Ibrutinib	85
6.3 IDELALISIB	86
6.3.1 Kombinations-Therapie mit Idelalisib	87
6.4 TEMSIROLIMUS	88
6.4.1 Kombinations-Therapie mit Temsirolimus	88
6.5 KOMBINATIONS-THERAPIE DER INHIBITOREN	90
6.6 MICROENVIRONMENT – FEEDER LAYER	92
6.6.1 Kombinations-Therapien ohne und mit Feeder Layer	94
6.7 FAZIT	98
<b>7 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>102</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>105</b>
<b>9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>114</b>
<b>10 TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>116</b>
<b>11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>117</b>
<b>12 ANHANG</b>	<b>119</b>
12.1 VERÖFFENTLICHTE TEILASPEKTE DIESER ARBEIT	128
12.2 DANKSAGUNG	129
12.3 LEBENSLAUF	130

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mantelzell-Lymphom

### 1.1.1 Epidemiologie, Klinik und Verlauf

Jedes Jahr erkranken weltweit mehr als 500000 Menschen an einem Non-Hodgkin Lymphom (NHL), was es zur häufigsten hämatologischen Malignität macht. [2] Allerdings zählen zahlreiche, teilweise nah miteinander verwandte Subtypen zur heterogenen Gruppe der NHL. Diese Subtypen lassen sich anhand charakteristischer morphologischer, immunphänotypischer, genetischer und klinischer Kriterien unterscheiden. [2, 3] Es wird zwischen T-Zell- und B-Zell-Non-Hodgkin Lymphomen unterschieden, wobei das Mantelzell-Lymphom (MCL) zu den reifen B-Zell-Neoplasien zählt und 6-9% der NHL ausmacht. [4-6] In der REAL-Klassifikation (Revised European-American Lymphoma Classification) wurden diverse Klassifikationen vereint (u.a. die Kiel-Klassifikation, diese führte das MCL noch als „zentrozytisches Lymphom“) um eine einheitliche und eindeutige Diagnosestellung bei NHL-Patienten zu ermöglichen. [3] Seit 2001 gilt das Mantelzell-Lymphom nach der WHO-Klassifikation (World Health Organisation), welche auf der REAL-Klassifikation beruht, als eigenständige Entität. [2, 4]

Die Inzidenz ist während der letzten Jahrzehnte stetig gestiegen und liegt aktuell bei 1-2/100000 jährlich. Das Mantelzell-Lymphom gilt als eines der aggressivsten Lymphome. [7] Die Krankheit tritt in einem Verhältnis von 3:1 (männlich : weiblich) auf und die Erstdiagnose wird meist im Alter von 60-65 Jahren gestellt. [5, 8] Bei Diagnosestellung präsentieren sich mehr als 90% der Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung (Ann Arbor Stadium III-IV). [9] Hierbei zeigt sich klinisch meist eine generalisierte Lymphadenopathie mit Splenomegalie, eine Infiltration des Knochenmarks (80-90% der Fälle) und ein leukämisches Blutbild (20-30% der Fälle). [6, 9-11] Auch extranodaler Befall von Leber, Gastrointestinaltrakt und Waldeyerschem Rachenring tritt häufig auf. [3, 7, 8, 12] Bei Fortschreiten der Krankheit kann prinzipiell jede Art von Gewebe infiltriert werden, es wurde beispielsweise von Beteiligung des Respirationstrakts, der Brust und der Haut berichtet. [9]

Das mittlere Gesamtüberleben (OS – Overall Survival) von Mantelzell-Lymphom-Patienten lag typischerweise bei nur 3-4 Jahren, aktuell wird von 5-7 Jahren OS

berichtet. [6-8] Das MCL vereint Charakteristika von indolenten und aggressiven Lymphomen und ist durch konventionelle Chemoimmun-Therapie bis heute nicht heilbar. [13] In 20-80% der Fälle wird durch eine aggressive First-Line-Therapie zwar eine vollständige Remission (CR – Complete Remission) erreicht, aber es kommt fast immer zu einem Rezidiv. [7] Dadurch ergibt sich insgesamt eine sehr schlechte Prognose, wobei beachtet werden muss, dass der Verlauf der Erkrankung stark variieren kann. [9]

Die Diagnose wird nach den Kriterien der WHO gestellt. Anhand einer Lymphknotenbiopsie kann der Tumor histologisch identifiziert werden. Eine Knochenmarkpunktion sollte durchgeführt werden um den Anteil der Infiltration und den Immunphänotyp durchflusszytometrisch und immunhistochemisch zu bestätigen. Zudem kann die pathognomonische Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$  durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) nachgewiesen werden. [5, 14] Zur Vervollständigung der Diagnostik zählt außerdem ein Differentialblutbild, eine laborchemische LDH- und Harnsäure-Bestimmung, ein HIV- (Human immunodeficiency virus) sowie ein Hepatitis B- und C-Test. [5]

Das Staging beim Mantelzell-Lymphom wird nach der Ann-Arbor-Klassifikation durchgeführt. Für die Einteilung ist eine Computertomographie (CT) von Hals, Thorax, Abdomen und Becken, sowie eine Knochenmarkpunktion notwendig.

Um die klinische Evaluation der Patienten zu erleichtern und die Prognose genauer einschätzen zu können wurde der "Mantle cell lymphoma International Prognostic Index" (MIPI) etabliert. [5, 9, 15] Dieser prognostische Index unterscheidet 3 Patientengruppen: die low-risk Gruppe mit einem 5-Jahres OS von 60%, die intermediate-risk Gruppe mit einem OS von 51 Monaten und die high-risk Gruppe mit einem OS von nur 29 Monaten. [14, 15] Hierfür werden 4 Parameter bewertet: der LDH-Spiegel, die Leukozytenzahl, das Alter und der Allgemeinzustand des Patienten. [14] Neben dem MIPI sollte auch der Ki-67-Proliferationsindex bestimmt werden. Es handelt sich hierbei um den etabliertesten biologischen Risikofaktor beim MCL und um einen wichtigen Indikator für die Prognose und den Langzeit-Verlauf der Krankheit. [5, 14]

### **1.1.2 Histomorphologie**

Bei den neoplastischen MCL-Zellen handelt es sich um reife B-Lymphozyten, welche allerdings Gene exprimieren die man sonst ausschließlich bei naiven B-Zellen findet

(IgD (Immunglobulin D), T-Zell-assoziiertes Antigen CD5). Seinen Namen erhielt das Mantelzell-Lymphom dadurch, dass sich die neoplastischen Zellen in der Mantelzone des Lymphfollikels der Lymphknoten ansiedeln. [7, 16] Ursprünglich konnte das MCL durch diese einzigartige histologische Anordnung identifiziert werden, trotzdem war die korrekte Diagnosestellung durch überlappende Eigenschaften mit anderen hämatologischen Neoplasien schwierig. [7, 17] Die Entdeckung der pathognomonischen Translokation t(11;14)(q13;q32) war notwendig um diesen Tumor genauer zu definieren und so die Unterscheidung von anderen NHL zu erleichtern. Auch morphologische Varianten des Tumors können dadurch leichter identifiziert werden. [7, 18]

Obwohl es sich beim Mantelzell-Lymphom um eine klar definierte Entität handelt variieren die histopathologischen Eigenschaften des Tumors. Histologisch werden 3 Subtypen basierend auf dem Wachstumsmuster des Lymphoms unterschieden: der Mantelzonen-Typ, der noduläre Typ und der diffuse Typ. In den meisten Fällen findet sich der diffuse Typ. Neoplastische Zellen die kragenförmig das reaktive Keimzentrum des Lymphknotens umschließen sind charakteristisch für den Mantelzonen-Typ, dieser findet sich aber eher selten. [3, 19] Zusätzlich zum histologischen Wachstumsmuster unterscheidet man beim Mantelzell-Lymphom 2 zytomorphologische Varianten, den klassischen und den blastoiden Typ. [19] Allerdings sind die MCL-Zellen nicht immer klar einem dieser beiden Typen zuzuordnen. Es findet sich ein ganzes Spektrum morphologischer Varianten, was den Ausschluss der Differentialdiagnosen CLL (Chronisch lymphatische Leukämie), Marginalzonen-Lymphom oder DLBCL (Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom) schwierig machen kann. [5, 14] Die meisten Tumore gehören dem klassischen Typ an. [5] Hier finden sich gleichförmige Lymphozyten mit wenig Zytoplasma, kleinen bis mittelgroßen leicht unregelmäßigen Zellkernen, kompaktem Chromatin, unscheinbaren Nukleoli und einer niedrigen Zell-Proliferationsrate. Der blastoide Typ zeigt klinisch ein aggressives Verhalten und zeichnet sich zytomorphologisch durch lymphoide Zellen mit mittelgroßen bis großen runden, eingekerbten Zellkernen, fein verteiltem Chromatin, unauffälligen Nukleoli und einer hohen Mitoserate aus. [3, 7, 14, 19]

### 1.1.3 Immunphänotyp

MCL-Zellen zeigen den Phänotyp reifer B-Zellen mit Expression von Immunglobulinen auf der Zelloberfläche (IgM oder IgD, vorwiegend mit  $\lambda$ -Leichtketten bzw.  $\lambda > \kappa$ ). [3, 7] Der klassische Immunphänotyp des Mantelzell-Lymphoms zeigt ein charakteristisches Muster B-Zell assoziierter Antigene (CD19, CD20, CD22, CD43, CD79a positiv, CD23 negativ). [14] Das T-Zell assoziierte Antigen CD5 wird ebenfalls exprimiert, was hilfreich ist um das MCL vom Marginalzonen-Lymphom abzugrenzen. [7] Die CD23-Negativität beim MCL ist ein wichtiger Faktor für die Abgrenzung von der CLL. [3, 7] Zudem sind MCL-Zellen typischerweise auch CD10 und BCL6 (Keimzentrumsmarker) negativ. [7] Die immunhistochemische Detektion der charakteristischen Cyclin D1 Überexpression oder der Nachweis der Translokation t(11;14)(q13;q32) durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ist zwingend nötig, da der histomorphologische Phänotyp variieren kann. [14]

### 1.1.4 Molekulare Pathogenese und Zytogenetik

Das Mantelzell-Lymphom zeichnet sich durch die chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32) aus, welche zur charakteristischen Überexpression des Zellzyklus-Regulator-Proteins Cyclin D1 führt. [14, 20, 21] Das Proto-Onkogen CCND1 wird von Chromosom 11q13 nach Chromosom 14q32 verschoben, wo sich das schwere-Ketten-Antikörper-Gen befindet. CCND1 kodiert für Cyclin D1, welches von normalen B-Zellen nicht exprimiert wird. Durch diese reziproke Translokation kommt es beim MCL zur pathognomonischen Überexpression von Cyclin D1. [3, 7, 22] Man geht davon aus, dass die Translokation eine zentrale Rolle in der Pathogenese dieses Tumors spielt. Durch Analysen der beiden beteiligten Chromosomen konnte gezeigt werden, dass der Translokationsvorgang bereits bei unreifen B-Zellen im Knochenmark stattfindet, noch bevor es zur V(D)J-Rekombination und somit zur Umlagerung der schweren Ketten der Antikörper kommt. [7, 22, 23] Das onkogene Potential dieser chromosomalen Aberration entwickelt sich allerdings erst vollständig wenn die B-Zellen im Lymphknoten reifen. [7]

Cyclin D1 bindet an die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 und aktiviert so durch Phosphorylierung von RB1 (Retinoblastom-Protein 1) den Transkriptionsfaktor E2F. RB1 fungiert durch seine Bindung an E2F als Tumor-Suppressor und verhindert so ein Fortschreiten im Zellzyklus. Durch die Phosphorylierung von RB1 beim MCL wird E2F frei. [6, 7] Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung von Cyclin E/CDK2,

wodurch der Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus ausgelöst wird. [7, 22] Insgesamt kommt es durch die Überexpression von Cyclin D1 zu einer Dysregulation des Zellzyklus und einer erhöhten Proliferationsrate der MCL-Zellen. [19]

Beim MCL könnte außerdem eine beeinträchtigte Kontrolle der späten G1-Phase und des G1/S-Überganges vorliegen. Dieser Schritt wird im Normalfall durch den CDK-Inhibitor p27 und den Cyclin E/CDK2-Komplex reguliert. Die Überexpression von Cyclin D1 scheint zu einer Komplexbildung von p27 mit CDK4 und Cyclin D1 zu führen, was p27 daran hindert einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase herbeizuführen. [7, 24, 25]

Das CCND1-Gen besteht aus 5 Exons, durch alternatives Splicing entstehen die Isoformen Cyclin D1a und Cyclin D1b. In den meisten Fällen werden beide Isoformen gleichzeitig exprimiert, jedoch findet sich Cyclin D1b nicht immer, so dass unklar ist ob Cyclin D1b überhaupt eine Rolle in der Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms spielt. [6, 26] Cyclin D1a hat einen langen 3' untranslatierten Bereich (UTR) in dem sich mRNA (messenger Ribonukleinsäure) destabilisierende Elemente (AUUUA-Sequenzen) befinden, die die Halbwertszeit von Cyclin D1a stark verkürzen. [6, 7, 27] Zusätzlich können miR15/16 (micro-RNA 15 und 16) an die 3' UTR binden und somit die Translation von Cyclin D1 hemmen. [6, 28, 29] Bei den Tumoren mit einer sehr hohen Proliferationsrate werden üblicherweise viele Cyclin D1a Transkripte mit einer verkürzten 3' UTR nachgewiesen, was mit einem aggressiven klinischen Verlauf und einem kurzen OS der Patienten einhergeht. [6, 7, 27] Diese kürzeren Cyclin D1a Transkripte entstehen durch Deletionen und Punktmutationen im 3' untranslatierten Bereich und sind stabiler als die ungekürzte mRNA. Zusätzlich gehen die miR15/16-Bindungsstellen durch die Verkürzung der mRNA verloren. Insgesamt steigern diese Veränderungen den Einfluss der t(11;14) Translokation auf das Zellwachstum, indem es zu einer stabileren Cyclin D1a-mRNA in höherer Konzentration und somit zu einer erhöhten Expression von Cyclin D1 kommt. Dies resultiert letztendlich in einer gesteigerten Tumor-Proliferation und einem kürzeren OS der MCL-Patienten. [6, 27]

Ein geringer Anteil von 5-10% aller Mantelzell-Lymphome ist allerdings Cyclin D1-negativ. Cyclin D1-negative MCL unterscheiden sich klinisch und morphologisch nicht von der Cyclin D1-positiven Variante. [7, 9, 30] SOX11, ein neuronaler Transkriptionsfaktor der von 90% aller MCL exprimiert wird, stellt einen hilfreichen diagnostischen Marker bei der Erkennung der Cyclin D1-negativen

Variante dar. Sowohl Cyclin D1-positive als auch -negative Varianten des MCL exprimieren SOX11, bei normalen Lymphozyten lässt sich der Transkriptionsfaktor jedoch nicht nachweisen. [6, 14, 22, 31, 32] Das macht SOX11 zu einem sehr spezifischen Marker für das Mantelzell-Lymphom. [22] Das Fehlen einer SOX11-Expression wurde hingegen als charakteristische Eigenschaft des indolenten MCL identifiziert. [5, 6] Des Weiteren zeigt sich bei Cyclin D1-negativen MCL eine Überexpression von Cyclin D2 oder D3. [6] Chromosomale Translokationen die das CCND2-Gen, welches Cyclin D2 kodiert, mit Immunglobulin-Genloci fusionieren treten in 50-55% der Fälle auf. [22, 33, 34] In seltenen Fällen findet sich die Translokation t(2;12)(p12;p13), wodurch Cyclin D2 mit dem κ-Leichtketten-Genlocus gekoppelt wird. [7, 33] Da auch Cyclin D2 und D3 an der Zellzyklus-Regulation und dem G1/S-Übergang beteiligt sind, wird die Bedeutung einer Dysregulation der G1-Phase für die Pathogenese des MCL ersichtlich. [7]

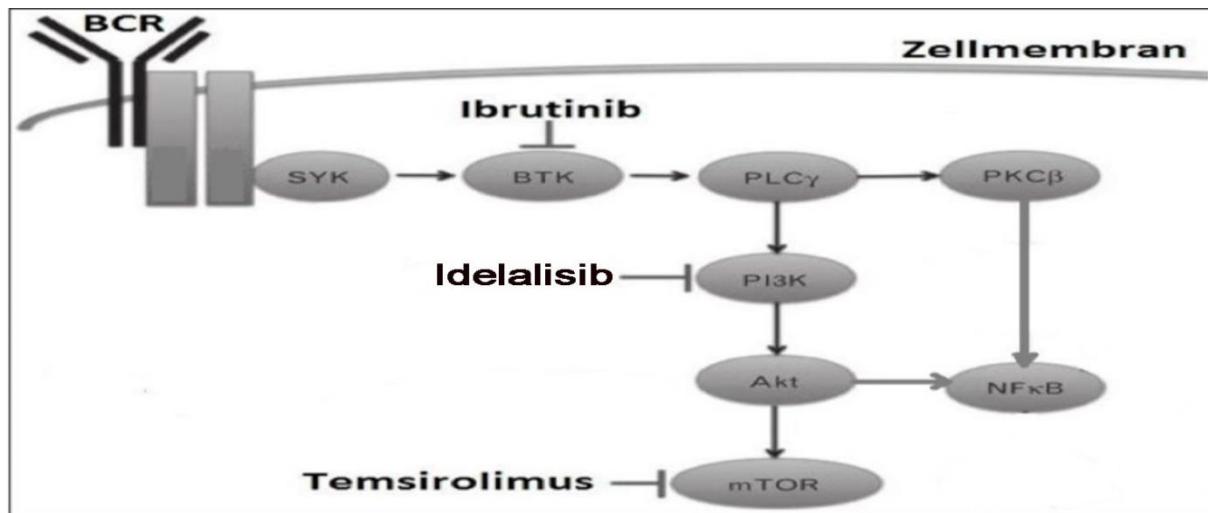
Trotzdem geht man davon aus, dass die alleinige Translokation t(11;14) und die damit einhergehende Cyclin D1-Überexpression für die Umwandlung von B-Lymphozyten in MCL-Zellen nicht ausreicht. [22] Zusätzlich zur pathognomonischen Zellzyklus-Dysregulation durch Cyclin D1 bilden genetische Veränderungen von Molekülen aus Signalwegen der Zellzyklus-Kontrolle, der DNA-Reparatur (DNA - Desoxyribonukleinsäure) oder eine Aktivierung von "cell survival pathways" die Grundlage der MCL-Pathogenese. [7, 22, 35] Sekundäre genetische Ereignisse die zur Inaktivierung von DNA-Reparatur-Signalwegen führen steigern das onkogene Potential von Cyclin D1. Gemeinsam führen diese Veränderungen zu einem schnelleren Fortschreiten des Zellzyklus und zu einer ausgeprägten genetischen Instabilität. [6]

Das Mantelzell-Lymphom zählt außerdem zu den B-Zell-Neoplasien mit dem höchsten Grad an genomischer Instabilität und einer großen Zahl sekundärer chromosomaler Alterationen. Hierzu zählen Loss- und Gain-of-function-Mutationen und Amplifikationen chromosomaler Regionen, welche Gene der Zell-Zyklus-Regulation, von DNA-Reparatur-Signalwegen, der Überlebens-Signaltransduktion oder der Apoptose enthalten. [6, 7] Der Ursprung der genetischen Instabilität beim MCL ist unter anderem auf Mutationen/Deletionen des DNA-Reparaturgens ATM auf dem langen Arm von Chromosom 11 zurückzuführen. [6]

#### 1.1.4.1 Der B-Zell-Rezeptor-Signalweg

Der PI3K/AKT-Signalpfad ist an der Übertragung einer Vielzahl extrazellulärer Signale beteiligt und spielt bei einigen malignen Erkrankungen eine Rolle. [6, 36] Bei normalen B-Zellen fungiert die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) als Signalüberträger des B-Zell-Rezeptor-Signalweges (BCR-Signalweg) und reguliert so Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zellen. Einige Schlüssel-Moleküle des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges sind beim Mantelzell-Lymphom aktiviert und spielen daher eine tragende Rolle in dessen Pathogenese. [6, 37, 38] Beim MCL wurden hohe Konzentrationen von aktiviert vorliegender AKT (Proteinkinase B) und mTOR (mammalian target of rapamycin) nachgewiesen. In beiden Fällen handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen die weitere Moleküle des Signalweges aktivieren können. [22, 37, 39, 40] AKT beeinflusst das Überleben der Zelle, die Zellteilung und die Apoptose. Die Aktivierung dieser Kinase ist essentieller Bestandteil der Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms. [8, 37, 40, 41] Eine dauerhafte Aktivierung von AKT konnte bei den meisten blastoiden und bei einigen klassischen Mantelzell-Lymphomen nachgewiesen werden. [6] Auch andere Kinasen, wie zum Beispiel SYK (spleen tyrosine kinase) oder BTK (Bruton's tyrosine kinase), die an der BCR-Signaltransduktion beteiligt sind, liegen beim MCL in phosphorylierter Form vor. [22, 42] Bei manchen Mantelzell-Lymphomen wurden auch Amplifikationen und eine Überexpression von SYK oder PI3K entdeckt. [22, 43, 44]

Die Signalkaskade des BCR-Signalweges und die Angriffspunkte der in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren werden in Abb. 1 veranschaulicht.



**Abbildung 1: Der B-Zell-Rezeptor-Signalweg**

Extrazelluläre Signale werden über den membranständigen B-Zell-Rezeptor (BCR) intrazellulär durch eine Signalkaskade weitergeleitet werden. Diese Signaltransduktion kann gezielt medikamentös, durch die ebenfalls gezeigten Inhibitoren Ibrutinib (BTK-Inhibitor), Idelalisib (PI3K-Inhibitor) und Temsirolimus (mTOR-Inhibitor), unterbrochen werden. Verwendete Abkürzungen: SYK (spleen tyrosine kinase), BTK (Bruton's tyrosine kinase), PLC $\gamma$  (Phospholipase C- $\gamma$ ), PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase), Akt (Proteinkinase B), mTOR (mammalian target of rapamycin), PKC $\beta$  (Proteinkinase C- $\beta$ ), NF $\kappa$ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells).

→ entspricht einer Aktivierung, —| entspricht einer Hemmung.

Quelle: Vgl. Waibel et al. 2014 [1]

Extrazelluläre Signale werden vom B-Zell-Rezeptor (BCR) durch Phosphorylierung der Tyrosin-Kinase SYK weitergeleitet. SYK aktiviert die Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), die Proteinkinase C- $\beta$  (PKC- $\beta$ ) und den PI3K/AKT-Signalweg. PI3K überträgt die BCR-Signale und kann durch SYK-abhängige Phosphorylierung von CD19 und dem B-Zell PI3K-Adapter Protein (BCAP) aktiviert werden. PI3K wiederum phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2), wodurch Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP3) entsteht. Diese Reaktion kann durch die Phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homologue) rückgängig gemacht werden, so entsteht aus PIP3 wieder PIP2. Des Weiteren phosphoryliert PI3K PDK1 (Phosphoinositid abhängige Kinase 1) und die Serin/Threonin-Kinase AKT. NF- $\kappa$ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) und mTOR1 werden dann durch AKT aktiviert. [6]

Beim MCL kann es durch Mutationen, Deletionen oder eine Methylierung des Promotors zu einem Verlust der Phosphatase PTEN kommen. Zu einer Inaktivierung von PTEN kann es durch eine Phosphorylierung von Serin 380 und Threonin 382 oder 383 kommen, was bei MCL-Fällen mit wesentlicher AKT-Aktivierung festgestellt wurde. Sowohl der Verlust als auch eine Inaktivierung von PTEN führt zu einem

Überwiegen der aktivierenden Einflüsse auf den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg. [6] Da dieser Signalweg so entscheidend für das Überleben der Tumorzellen des Mantelzell-Lymphoms zu sein scheint, bietet er attraktive molekulare Ziele für neuartige Therapien. [8, 45, 46] PI3K- und mTOR-Inhibitoren sind beispielsweise in der Lage die Translation von Cyclin D1 zu hemmen. Das führt zu einer verminderten Expression von Cyclin D1 und zusätzlich zur Hemmung der CDK-Funktion. [6]

### 1.1.5 Microenvironment

Zusätzlich zur vielschichtigen Pathogenese des MCL spielen Interaktionen mit dem "Microenvironment" des Tumors (TME – tumor microenvironment) eine entscheidende Rolle für das Zellwachstum und das Überleben der Tumorzellen. [47] B-Zell-Lymphome sind von einer komplexen Interaktion neoplastischer B-Zellen mit ihrer Umgebung, dem sogenannten Microenvironment, geprägt. Dies besteht u.a. aus Stromazellen, einer Vielzahl von Makrophagen, NLC (Nurselike cells) und (regulatorischen) T-Zellen. Die Kommunikation dieser unterschiedlichen Zell-Populationen wird durch zelluläre Strukturen und Signalstoffe (Chemokine, Chemokin-Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle, ECM – extrazelluläre Matrix) gewährleistet. [48-50] Die Mehrzahl der B-Zell-Neoplasien ist von der Expression eines funktionierenden B-Zell-Rezeptors (BCR) und intakter BCR-Signaltransduktion abhängig, da es andernfalls zum raschen Eintritt des Zelltodes kommen würde. [51-53] Beim MCL liegt der BCR-Signalweg (und somit auch der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg) in aktiver Form vor und trägt maßgeblich zur Pathogenese und zum Überleben der Tumorzellen bei. [51, 54] Man geht davon aus, dass der BCR durch extrinsische Signale des TME stimuliert wird und dies zu einer Aktivierung der Signalkaskade führt. So wird das Überleben der MCL-Zellen gesichert und ein weiteres Wachstum der Neoplasie gefördert. [50, 55, 56] Es konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stromazellen MCL-Zellen vor spontaner und therapie-induzierter Apoptose schützen. [56-58] Zusätzlich geht man davon aus, dass die hohe Rezidivrate durch residuale MCL-Zellen verursacht werden könnte, die im Gewebe durch das TME abgeschirmt und vor toxischen Einflüssen geschützt werden. Dies führt zu einer Therapieresistenz, man spricht von einer environment-mediated drug resistance (EMDR). Diese Resistenz soll durch Zell-Zell-Adhäsion-vermittelte Aktivierung des BCR-Signalweges zwischen Stroma- und Lymphomzellen entstehen. [50, 55] Die therapeutische Effektivität von gezielt in die BCR-

Signaltransduktionskaskade eingreifenden Inhibitoren wird u.a. auch der Blockade der Lymphom-TME-Interaktion zugeschrieben. [50]

In vitro konnte die Abhängigkeit der MCL-Zellen von überlebensfördernden Faktoren durch Co-Kultur mit Stromazellen ebenfalls bestätigt werden. Das gleichzeitige Kultivieren verbesserte das Zellüberleben und schützte die Tumorzellen vor den zytotoxischen Effekten der Chemotherapie. [59, 60] Außerdem wurde das spontane migrieren der Lymphomzellen und deren adhärent werden an der Stromazell-Schicht (Feeder Layer) beschrieben. [55, 61] Bei MCL-Zellen konnte während der Co-Kultivierung mit Stromazellen die Entwicklung einer Therapieresistenz bei Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika (Doxorubicin, Melphalan) beobachtet werden. Dieser Mechanismus wurde als „cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR)“ beschrieben. [55, 61, 62] Des Weiteren wurde die Stimulation des anti-apoptotischen NF-κB-Signalweges, sowie eine Aktivierung von SYK und AKT nachgewiesen. [50, 58, 63] Man geht davon aus, dass eine Blockade der TME-Tumorzell-Interaktion die beschriebenen Resistenz-Mechanismen durchbrechen kann. Dies wird durch Therapeutika, die gezielt an Schlüsselmoleküle des BCR-Signalweges (SYK, BTK, PI3K) binden, bewerkstellt. [55]

In dieser Arbeit wurden adhärente Stromazellen als Feeder Layer zur Co-Kultivierung mit MCL- und ALL-Zellen (Akute lymphatische Leukämie) eingesetzt. Die M2-10B4-Stromazellen (Fibroblasten) wurden verwendet, um die *in vivo* stattfindende Interaktion von hämatologischen Zellen mit Bindegewebszellen (TME) *in vitro* zu imitieren. [64] In vitro sollten die MCL- und ALL-Zellen durch Signale und Botenstoffe der Fibroblasten, die eine Aktivierung des BCR-Signalweges bewirken, zur Proliferation angeregt werden. [63-66] In Co-Kultivierung von CLL-Zellen (Chronisch lymphatische Leukämie) mit M2-10B4-Zellen wurde festgestellt, dass eine signifikante Hochregulierung von Genen des PI3K/NF-κB/AKT-Signalwegs induziert wurde, was zu einem längeren Überleben der CLL-Zellen führte. Des Weiteren wurden bei direktem Zell-Zell-Kontakt pro-angiogenetische Effekte und eine Hochregulierung von VEGF (vascular endothelial growth factor) und DNA-Reparatur-Genen festgestellt. [67]

Durch Co-Kultivierung sollte in dieser Arbeit ein Vergleich der therapeutischen Wirksamkeit der Inhibitoren in Mono- und Kombinations-Therapie ohne und mit Feeder Layer ermöglicht werden.

### 1.1.6 Therapie

In den meisten Fällen zeigen Mantelzell-Lymphome einen aggressiven klinischen Verlauf, was eine Hochdosis-Chemo-Immunotherapie notwendig macht. Allerdings gibt es auch wenige Patienten mit indolenten MCL, die ohne jegliche Therapie 5 bis 10 Jahre überleben. Trotz Vorhandensein der typischen Translokation t(11;14) und einer Cyclin D1-Überexpression ist die Erkrankung hier auf einzelne Lymphknoten oder das periphere Blut beschränkt. [7] Die heterogene Klinik der unterschiedlichen Formen des MCL stellt eine große Herausforderung dar und macht es sehr schwierig eine einheitliche Standard-Therapie festzulegen. [22, 68]

Bis heute gilt das MCL als unheilbar, obwohl das Ansprechen auf die initiale Therapie sehr hoch ist. Es kommt nahezu ausnahmslos zu einem Rezidivieren der Erkrankung mit tendenziell niedrigeren Ansprechraten und einer kürzeren Remissionsdauer bei erneuter Therapie. [5, 8, 14] Prinzipiell richtet sich die Wahl der Therapie nach dem Allgemeinzustand, der Komorbidität und dem Alter des Patienten. Erkrankte unter 65 J. gelten als „jüngere Patienten“, die Betroffenen die bereits über 65 Jahre alt sind gelten als „ältere Patienten“. [13, 22]

#### 1.1.6.1 First-Line-Therapie

Bei jungen, fitten Patienten hat sich ein dosisintensiverer Therapieansatz bewährt. Beispielsweise wird R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison) mit hochdosiertem Cytarabin (Ara-C) kombiniert und im Anschluss eine autologe Stammzelltransplantation (ASCT) durchgeführt. Diese Art der Behandlung führte zu einem besseren Therapieansprechen und einer höheren Überlebensrate. [5, 9, 13, 14, 69] Eine randomisierte Studie zeigte, dass der ergänzende Einsatz von Cytarabin die mittlere Zeit bis zum Therapieversagen (TTF – time to treatment failure) signifikant verlängerte. [5, 70] Wenn die Patienten gut auf R-CHOP ansprechen, kann die Konsolidierungstherapie auch aus einer Ganzkörperbestrahlung (TBI – total body irradiation), hochdosiertem Cyclophosphamid und ASCT bestehen. [14] Alternativ steht auch eine Induktionstherapie aus 3 Zyklen R-CHOP gefolgt von 3 Zyklen R-DHAP (Rituximab, Dexamethason, Cytarabin, Cisplatin) einer myeloablativen Ara-C-haltigen Konsolidierungstherapie mit anschließender ASCT zur Verfügung. Dieses Behandlungsschema verbesserte TTF und OS signifikant im Vergleich zu einer alleinigen Induktionstherapie durch R-CHOP. [14, 70]

Da das mittlere Erkrankungsalter bei ca. 65 Jahren liegt, kann die Mehrheit der MCL-Patienten nicht mit Hochdosis-Therapie-Regimen behandelt werden. Bei älteren Patienten kommt daher eine kombinierte Immuno-Chemotherapie zum Einsatz. Zum Einen wird das Therapie-Regime R-CHOP, zum Anderen eine Kombination aus Rituximab und Bendamustin (BR) verwendet. Nach einer R-CHOP-Therapie sollte eine Erhaltungstherapie mit Rituximab durchgeführt werden, da diese PFS (progression free survival) und OS signifikant verlängert. [5, 9, 13, 14, 71-73]

In einer randomisierten Studie wurde R-CHOP mit dem BR-Regime als Erstlinientherapie verglichen. Es zeigte sich, dass die Kombination aus Bendamustin und Rituximab mindestens genauso effektiv war wie die bisherige Standard-Therapie. Das OS war bei beiden Regimen vergleichbar. Zudem wurden weniger Nebenwirkungen, wie Neutropenie, Infektionen, Polyneuropathie und Aloperie, bei einer Anwendung von BR festgestellt. Daher sollte dieses Therapie-Schema bei Patienten mit Komorbiditäten bevorzugt eingesetzt werden. [14, 72] Die Wirksamkeit einer zusätzlichen Gabe von Cytarabin wurde ebenfalls untersucht. Das R-BAC-Regime (Rituximab, Bendamustin, Cytarabin) erzielte exzellente Ergebnisse als First- und Second-Line-Therapie. Die ORR lag bei 90%, 83% erreichten eine CR und das PFS nach 2 Jahren betrug 70% im Rezidiv und sogar 95% nach Erstlinientherapie. Allerdings wurde eine beachtliche Hämatotoxizität beobachtet, was dieses Therapieschema nur für Patienten in einem guten Allgemeinzustand sinnvoll macht. [14, 74]

Falls sich Patienten erst im Stadium I oder II (nach Ann Arbor) der Erkrankung befinden, wird eine verkürzte konventionelle Chemotherapie eingesetzt. Als Konsolidierungstherapie sollte dann eine Radiotherapie erfolgen. [5, 9, 75]

### **1.1.6.2 Therapie bei Rezidiven**

Generell sollte anhand verschiedener Faktoren (Alter, Allgemeinzustand, First-Line-Therapie, Knochenmarkreserve, histologischer Subtyp des MCL) die angemessenste Therapie ausgewählt werden. [9, 13, 14] Daher hat sich bis heute noch kein Regime als Standard-Zweitlinien-Therapie des rezidivierten oder refraktären MCL etabliert. [9] Welches Therapieschema eingesetzt wird richtet sich nach der verwendeten First-Line-Therapie. Bei einem Rezidiv der Erkrankung nach weniger als 12-24 Monaten sollte beispielsweise R-BAC nach einer Erstlinientherapie mit R-CHOP, und umgekehrt R-CHOP nach R-BAC, eingesetzt werden. [5, 74]

Bei jüngeren Patienten stellt die allogene Stammzelltransplantation, trotz der hohen Mortalität und Rezidivrate, die einzige potenziell kurative Therapie dar. Es konnten sogar Langzeit-Remissionen bei MCL-Patienten mit Früh-Rezidiv oder therapie-refraktärer Erkrankung erzielt werden. Diese Option sollte daher, auch bei Rezidivieren der Erkrankung nach autologer SCT (Stammzelltransplantation), mit geeigneten Patienten diskutiert werden. [5, 13, 14, 76]

Eine Vielzahl gezielter therapeutischer Optionen in Kombination mit Rituximab-haltiger Chemo-Immunotherapie steht älteren Patienten zur Verfügung. Nach R-CHOP als First-Line-Therapie hat sich ein Regime aus Rituximab, Cytarabin und/oder Bendamustin in Kombination mit einem molekularen Therapeutikum (Ibrutinib, Bortezomib, Lenalidomid oder Temsirolimus) als effektiver Therapieansatz als wirksam erwiesen. Ein angepasstes Behandlungskonzept, basierend auf dem individuellen Risikoprofil, stellt auch Cytarabin in Kombination mit Bortezomib oder Bendamustin, bei fitten Patienten mit erhöhtem Ki67-Proliferationsindex, dar. Bei älteren Patienten mit einem indolenten MCL ist hingegen Bendamustin kombiniert mit Temsirolimus oder Lenalidomid ein geeignetes Therapie-Regime. MCL-Patienten in einem schlechten Allgemeinzustand profitieren sowohl von Monotherapien mit gezielt wirkenden Therapeutika (Bortezomib, Lenalidomid, Temsirolimus oder Ibrutinib), als auch von einer Kombination aus Rituximab, Steroiden und niedrig dosierter Chemotherapie mit palliativer Bestrahlung. [6, 13, 14, 77-86]

Im Folgenden soll auf diese molekular gezielt wirkenden Medikamente, und deren Stellenwert in der Therapie des Mantelzell-Lymphoms, näher eingegangen werden.

## 1.2 Targeted Therapy – Molekular gezielte Therapie

Im Gegensatz zur konventionellen Therapie des Mantelzell-Lymphoms mit den unter 1.1.6 genannten Therapie-Regimen, werden heute bei therapieresistenten Verläufen oder im Rezidiv „Targeted Therapies“ angewandt. Das wachsende Verständnis der Pathogenese, der dabei beteiligten Signalwege und deren Schlüsselmoleküle, ebnete den Weg für die systematische Entwicklung gezielter therapeutischer Strategien. [6, 7, 13, 14] Es wurden unter anderem Therapeutika hergestellt, deren Zielstrukturen Moleküle des BCR- und des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges darstellen. [6]

Auf 3 Medikamente, die in dieser Arbeit in vitro analysiert wurden und ihren Einsatz in der Therapie des Mantelzell-Lymphoms finden, soll nun näher eingegangen werden.

### 1.2.1 Ibrutinib

Ibrutinib (PCI-32765) ist ein oraler Inhibitor der Bruton's Tyrosin Kinase (BTK), die eine Schlüsselrolle im B-Zell-Rezeptor-Signalweg (BCR-Signalweg) innehat. [8, 14] Die selektive und permanente Hemmung der BTK resultiert in einer unterdrückten B-Zell-Aktivierung und einer gehemmten BCR-Signaltransduktion. [8, 87] Eine BTK-Hemmung kann daher bei verschiedenen B-Zell-Neoplasien (MCL, CLL, DLBCL) Apoptose induzieren. [59, 88-90]

In klinischen Studien konnte bereits eine dauerhafte Wirkung durch Ibrutinib-Monotherapie beim rezidivierten oder therapie-refraktären MCL nachgewiesen werden. [14, 84] In einer internationalen Phase-II-Studie beschrieben Wang et al. sowohl die gute Wirksamkeit des Medikamentes, als auch seine ausgezeichnete Verträglichkeit. Die ORR (overall response rate) lag bei 68% (21% in CR (complete remission)) und das mittlere progressionsfreie Überleben (PFS) betrug 13,9 Monate. Nebenwirkungen wie Diarrhoe, Müdigkeit und Übelkeit fielen mild (Grad 1) bis mäßig (Grad 2) aus. Selten wurden bei den Patienten drittgradige oder schlimmere hämatologische Nebenwirkungen beobachtet. 16% litten unter einer Neutropenie, bei 11% zeigte sich eine Thrombozytopenie und 10% bekamen eine Anämie. [8, 9, 14, 84]

In einer Phase-III-Studie wurde die Wirksamkeit von Ibrutinib im Vergleich zu Temsirolimus bei Rezidiv-Patienten getestet. [91] Eine andere Phase-III-Studie untersucht das BR-Regime (Rituximab, Bendamustin) in First-Line-Therapie mit und ohne die zusätzliche Gabe von Ibrutinib. [14]

Bereits im Jahr 2013 wurde dieses Medikament von der FDA (Food and Drug Administration) in den USA für die Therapie des rezidivierten und therapie-refraktären MCL zugelassen. [51, 59] Seit 2014 ist Ibrutinib auch in der EU für die Behandlung von Patienten mit rezidiviertem oder therapierefraktärem MCL zugelassen. [84, 92, 93]

### 1.2.2 Idelalisib

Idelalisib (Cal-101, GS-1101) zählt ebenfalls zur Gruppe der „Targeted Therapies“. Es handelt sich bei diesem Medikament um einen oralen Phosphoinositid-3-Kinasen-Inhibitor (PI3K-Inhibitor), welcher selektiv an die p110 $\delta$ -Untereinheit des Enzyms bindet. [8, 14, 94] Die p110 $\delta$ -Isoform der PI3K wird bei B-Lymphozyten stark exprimiert, stellt einen Signaltransduktor der BCR-Signalkaskade dar und ist ein Schlüsselmolekül des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges. In vitro konnte Apoptose-Induktion und ein Absinken des Spiegels phosphorylierter AKT bei einer Vielzahl hämatologischer Neoplasien (u.a. MCL und CLL) beobachtet werden. [6, 8, 49, 94-96] Zusätzlich zur Inaktivierung von AKT wird auch mTOR inaktiviert, Cyclin D1 herunter reguliert und somit ein Zellzyklus-Arrest induziert. Außerdem wird die p53-vermittelte Apoptose herbeigeführt. [6]

Bei MCL-Patienten im Rezidiv wurde eine vielversprechende ORR von 62% erreicht, allerdings schien die Remissionsdauer begrenzt zu sein. [9, 14, 22, 95, 97] Aktuell werden weitere Studien durchgeführt, die die Wirksamkeit von PI3K-Inhibitoren beim Mantelzell-Lymphom untersuchen. Hierbei wird zum Beispiel der PI3K-Inhibitor mit dem BR-Schema (Bendamustin, Rituximab) kombiniert. [95]

In der Rezidiv-Therapie einiger anderer Entitäten (CLL, folliculäres B-Zell-Lymphom, B-SLL (small lymphocytic lymphoma – CLL-Unterform)) ist Idelalisib bereits seit 2014 zugelassen. [98-100]

### 1.2.3 Temsirolimus

Die Serin/Threonin-Kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) stellt ein weiteres attraktives Ziel für molekulare Therapeutika dar. [8, 22, 101] Sie besteht aus den Komplexen mTORC1 (mTOR-Raptor) und mTORC2 (mTOR-Rictor). Ist die Signalkaskade aktiviert, führt mTORC1 zu einer gesteigerten Translation von Cyclin D1. Daher ist die Hemmung dieser Kinase ein vielversprechender Ansatz in der Therapie des Mantelzell-Lymphoms. [6, 7]

Temsirolimus (CCI-779) ist ein Rapamycin-Analogon, welches mTORC1 allosterisch hemmt und dadurch einen Zellzyklus-Arrest induziert. [6, 22] Die gute Anti-Tumor-Aktivität des intravenös zu verabreichenden Medikamentes beim MCL konnte in zwei Phase-II-Studien gezeigt werden. Die ORR betrug 38-41%, das mittlere PFS lag bei 6-6,5 Monaten und als hauptsächliche Nebenwirkung wurde eine Thrombozytopenie beobachtet, die durch eine Dosisreduktion behandelt werden konnte. Auf der Basis

dieser positiven Ergebnisse wurde eine randomisierte Phase-III-Studie geplant. [9, 102, 103]

In dieser multizentrischen Phase-III-Studie konnte die Überlegenheit einer Temsirolimus-Monotherapie gegenüber anderen Monotherapien, die bisher ihren Einsatz in der Therapie des rezidivierten oder therapie-refraktären MCL fanden, demonstriert werden. Daraufhin wurde Temsirolimus von der EMA (European Medicines Agency) für diese Indikation als erstes gezieltes (targeted) Therapeutikum zugelassen. [6, 9, 22, 82] Am häufigsten kam es durch die Therapie mit dem mTOR-Inhibitor zu Myelosuppressionen, Mukositiden, Hyperglykämien, Hypertriglyceridämien, Infektionen und Müdigkeit. [8] Als dritt- bis viertgradige Nebenwirkungen traten Thrombozytopenien, Neutropenien und Anämien auf. [9]

## 2 Zielsetzungen dieser Arbeit

Das Mantelzell-Lymphom stellt immer noch eine unheilbare Entität und eine große Herausforderung an die moderne Medizin dar. In den meisten Fällen nimmt es einen aggressiven klinischen Verlauf, welcher eine Hochdosis-Chemo-Immunotherapie notwendig macht. Trotz des meist guten Ansprechens auf die First-Line-Therapie kommt es fast immer zu einem Rezidivieren der Erkrankung. Ein schlechter Langzeit-Verlauf und mittleres Überleben (OS) von 5-7 Jahren sind weitere Charakteristika des MCL. Insgesamt hat das Mantelzell-Lymphom die schlechteste Prognose aller B-NHL. [6, 9, 14, 104, 105] Die hohe Rezidivrate machte eine Entwicklung neuer Therapie-Optionen erforderlich. [9]

Die komplexe Pathophysiologie dieses Tumors ist durch die Translokation t(11;14), die in einer Cyclin D1-Überexpression mündet, geprägt. Aber auch eine Veränderung von DNA-Reparaturmechanismen und die konstitutive Aktivierung des anti-apoptotischen PI3K/AKT/mTOR-Signalweges leisten ihren Beitrag zur Entstehung einer Zellzyklus-Dysregulation und genetischer Instabilität. [8] Neuartige Therapie-Ansätze sind auf die einzigartige Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms abgestimmt und wirken gezielt auf Schlüsselmoleküle verschiedener Signal-Transduktions-Wege. [8, 22]

In dieser Arbeit wird die *in vitro* Wirksamkeit 3 dieser vielversprechenden Medikamente evaluiert.

Ibrutinib (BTK-Inhibitor), Idelalisib (PI3K-Inhibitor) und Temsirolimus (mTOR-Inhibitor) wurden sowohl in Mono-, als auch in Kombinations-Therapie mit Bendamustin, Cytarabin, Cisplatin und Dexamethason verwendet. Bei den 4 Medikamenten, die zur Kombination mit den Inhibitoren eingesetzt wurden, handelt es sich um etablierte Zytostatika verschiedener Regime der konventionellen MCL-Therapie (z.B. BR-Regime, R-BAC, R-DHAP). Zum Vergleich wurden ALL-Zellen (Akute lymphatische Leukämie) der humanen Zelllinie BALL-1 verwendet.

Ziel dieser Arbeit ist es, additive oder synergistische Effekte in der Kombinations-Therapie aufzudecken. Mit diesen Ergebnissen sollen sinnvolle Kombinationen von Zytostatika und molekularen Inhibitoren aufgezeigt werden, um gegebenenfalls den Weg für neuartige effektive Therapie-Regime zu ebnen.

### 3 Material

#### 3.1 Reagenzien, Lösungen und Puffer

Bezeichnung		Hersteller
Annexin V Binding Buffer		BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
Annexin V-FITC		BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (>99,9%), 472301	DMSO	Sigma-Aldrich GmbH
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, without $Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$	DPBS	PAN Biotech GmbH Aidenbach
Ethanol 70%	EtOH 70%	CLN GmbH Altdorf (Niederbayern, Deutschland)
Fetal Bovine Serum	FBS	PAN Biotech GmbH Aidenbach
Propidium Iodide		BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
RPMI-1640 mit L-Glutamin	Medium	PAN Biotech GmbH Aidenbach
Trypanblau ( 0,4% ), T8154		Sigma-Aldrich GmbH
Trypsin-EDTA		PAN Biotech GmbH Aidenbach

**Tabelle 1: Verwendete Reagenzien, Lösungen und Puffer**

Für die Apoptose-FACS-Analysen wurde das „Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I“ von BD Biosciences Pharmingen benutzt.

Für die Propidiumiodid-Färbung bei den Zellzyklus-Analysen wurde der Lysis-Puffer in folgender Zusammensetzung hergestellt:

Natriumzitrat	100 mg
Triton X-100	100 µl
Propidiumiodid	2 mg
Aqua purificata	ad 100 ml
mit HCL titriert	pH 8.0

## 3.2 Therapeutika

### 3.2.1 Inhibitoren

Inhibitor	Bezeichnung	Hersteller	Verwendete Standarddosis
Ibrutinib	PCI-32765 BTK-Inhibitor	Pharmacyclics, Inc. 995 E. Arques Avenue, Sunnydale (CA, USA)	10 nM (mit DMSO verdünnt)
Idelalisib	Idelalisib PI3K-Inhibitor	Intellikine, Inc. 10931 North Torrey Pines Road (CA, USA)	5 µM (mit DMSO verdünnt)
Temsirolimus	CCI-779 mTOR-Inhibitor	LC Laboratories, 165 New Boston Street, Woburn (MA, USA)	10 nM (mit DMSO verdünnt)

**Tabelle 2: Verwendete Inhibitoren, deren Hersteller und deren Dosierung**

### 3.2.2 Zytostatika

Die verwendeten Zytostatika wurden von der Apotheke des Klinikums Großhadern bezogen, gegebenenfalls mit DMSO verdünnt um die gewünschte Dosierung zu erreichen, und direkt eingesetzt.

Wirkstoff	Hersteller	Verwendete Standarddosis
Bendamustin	2,5 mg/ml Levact® in NaCl Mundipharma GmbH	5 µg/ml (unverdünnt)
Cisplatin	1 mg/ml Cisplatin Accord® Accord Healthcare GmbH	1 µM (mit DMSO verdünnt)
Cytarabin	100 mg/ml ARA-cell® inNaCl Cell Pharm GmbH	2,5 ng/ml (mit DMSO verdünnt)
Dexamethason	4 mg/ml Dexa Inject Jenapharm® mibe GmbH Arzneimittel	1 mM (unverdünnt aus 4 mg/ml Ampullen)

**Tabelle 3: Verwendete Zytostatika, deren Hersteller und deren Dosierung**

### 3.3 Verwendete Geräte

Zellzählgerät:	Bezeichnung:	Vi-CELL
	Hersteller:	Beckmann Coulter (Fullerton CA,USA)
Durchflusszytometer:	Bezeichnung:	BD FACS Calibur
	Hersteller:	BD Biosciences (Palo Alto CA, USA)

## 4 Methodik

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 Verwendete Zelllinien

Für diese Arbeit wurde die humane ALL-Zelllinie BALL-1 als Vergleichs-Zelllinie eingesetzt. Bezogen wurden die Zellen über die JRCB Cell Bank in Osaka, Japan. Bei den Zelllinien Granta 519, JeKo-1, MAVER-1, Mino, Rec-1 und Z-138 handelt es sich um etablierte, humane Mantelzell-Lymphom-Zelllinien. Zur Verfügung gestellt wurden diese von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig.

Zelllinien	Charakterisierung
<b>BALL-1 [106]</b>	<b>prä-B-ALL</b> , 1976 etabliert aus dem peripheren Blut eines 75-jährigen Patienten
<b>Granta 519 [107]</b>	<b>B-NHL (MCL)</b> , 1991 etabliert aus dem peripheren Blut einer 58-jährigen Patientin
<b>JeKo-1 [108]</b>	<b>B-NHL (MCL)</b> , 1998 etabliert aus dem peripheren Blut einer 78-jährigen Patientin
<b>MAVER-1 [109]</b>	<b>B-NHL (MCL)</b> , 2003 etabliert aus dem peripheren Blut eines 82-jährigen Patienten
<b>Mino [110]</b>	<b>B-NHL (MCL)</b> , 1997 etabliert aus dem peripheren Blut einer 68-jährigen Patientin
<b>Rec-1 [111]</b>	<b>B-NHL (MCL)</b> , 1987 etabliert einem Lymphknoten oder dem peripheren Blut eines 61-jährigen Patienten
<b>Z-138 [112, 113]</b>	<b>B-NHL (MCL)</b> , 1990 etabliert aus dem Knochenmark eines 70-jährigen Patienten

**Tabelle 4: Verwendete MCL- und ALL-Zelllinien**

Die Herkunft der etablierten humanen MCL-Zelllinien Granta 519, JeKo-1, MAVER-1, Mino, Rec-1 und Z-138, sowie der ALL-Vergleichs-Zelllinie BALL-1 wird hier dargestellt.

#### 4.1.2 Bedingungen und Durchführung der Zellkultivierung

Die MCL- und ALL-Zellen wurden im Brutschrank bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% und 5% CO<sub>2</sub>, und einer Temperatur von 37°C, der menschlichen Körpertemperatur entsprechend, kultiviert. Als Medium wurde RPMI-1640 mit 10%

fetalem Kälberserum (FBS) eingesetzt und es wurden Zellkulturflaschen von Sarstedt AG & Co. Nümbrecht verwendet.

Alle 2-3 Tage wurde die Zelldichte in den Kulturflaschen mittels Vi-CELL bestimmt und die Zellen gesplittet. Hierbei wurde, je nach Zelldichte, die Hälfte bis  $\frac{3}{4}$  der Zellsuspension verworfen und durch frisches Medium ersetzt. So standen den Zellen stets genügend Nährstoffe für den Zellstoffwechsel und die Zellteilung zur Verfügung. Das FBS wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und musste vor dem ersten Gebrauch 50 min lang in einem  $56^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad erhitzt werden. Dieser Schritt diente der Zerstörung von hitzeempfindlichen Anteilen des Komplementsystems im Serum.

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

Zum Einfrieren der verwendeten Zelllinien wurden diese bei 1000 Umdrehungen/Minute für 5 min abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das so erhaltene Zellpellet wurde dann in  $4^{\circ}\text{C}$  kaltem FBS und DMSO (90% FBS und 10% DMSO) resuspendiert und direkt im Anschluss bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

Um eingefrorene Zellen erneut zu kultivieren wurden diese bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und dann in 10 ml RPMI resuspendiert und für 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt ist nötig um das zelltoxische DMSO auszuwaschen. Nachdem der Überstand verworfen wurde, folgte die Resuspension des Zellpellets in 20 ml RPMI mit 20% FBS. Direkt nach dem Auftauen und ein weiteres Mal nach 24 Stunden erfolgte eine Zellzählung mittels Vi-CELL um die Viabilität und die Zelldichte zu bestimmen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gesplittet und in RPMI mit 10% FBS weiter kultiviert.

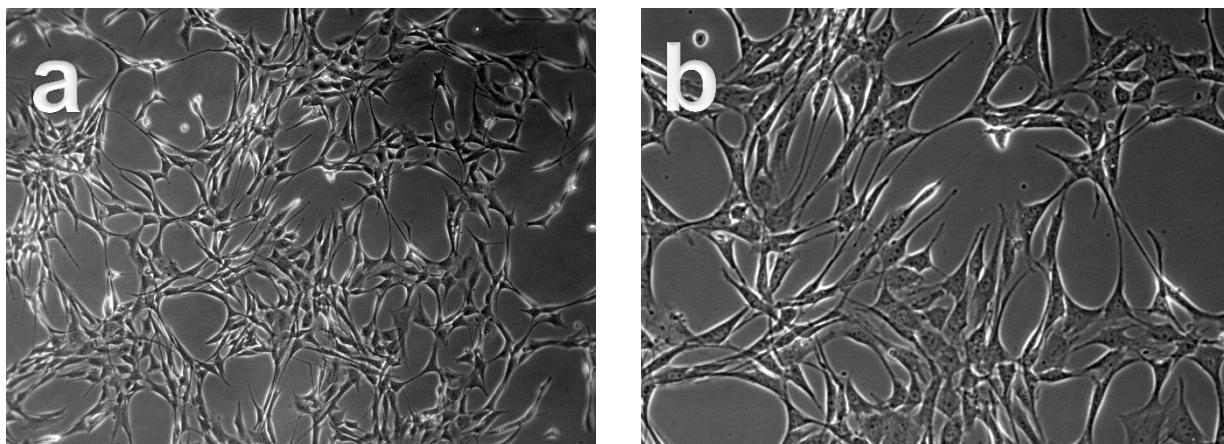
## **4.2 Feeder Layer**

In dieser Arbeit wurden adhärente Feeder Layer Zellen zur Co-Kultivierung mit MCL- und ALL-Zellen eingesetzt. Diese wurden über die American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) bezogen. Es handelt sich um eine aus dem Knochenmark einer (C57BL/6J X C3H/HeJ) F1 Maus stammende Fibroblasten-Zelllinie (murine bone marrow fibroblast cell line M2-10B4). Zu den Zelllinien-Charakteristika zählen die Expression von Laminin und Kollagen Typ IV und die fehlende Expression von Kollagen Typ I und Faktor VIII. [67, 114-118]

#### 4.2.1 Kultivierung und Bestrahlung

Diese Zellen wurden ebenfalls unter den bei Punkt 4.1.2 genannten Bedingungen kultiviert. Da sich die Feeder Layer Zellen am Boden der Kulturflaschen absetzen und dort adhärent werden, wurden sie zu weiteren Verwendung mit Hilfe von Trypsin vom Boden abgelöst und resuspendiert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde mit frischem RPMI-Medium aufgefüllt und dann mit einer Dosis von 80 Gy bestrahlt. [116, 119, 120] Die Bestrahlung führt zu einem Proliferations-Stopp der Feeder Layer Zellen, ihr Stoffwechsel bleibt erhalten. [116, 120]

Die bestrahlten Zellen wurden in einer Konzentration von  $0,75 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> erneut in Kulturflaschen mit RPMI-Medium ausgebracht. Nachdem sich die Zellen adhärent am Flaschenboden abgesetzt hatten, wurde der Medien-Überstand verworfen und MCL- oder ALL-Zellen mit  $0,5 \times 10^6$  cells/ml RPMI darauf für 48 Stunden inkubiert. Während der Inkubation sollten die Zellen durch Wachstumsfaktoren der Feeder Layer Zellen aktiviert werden.



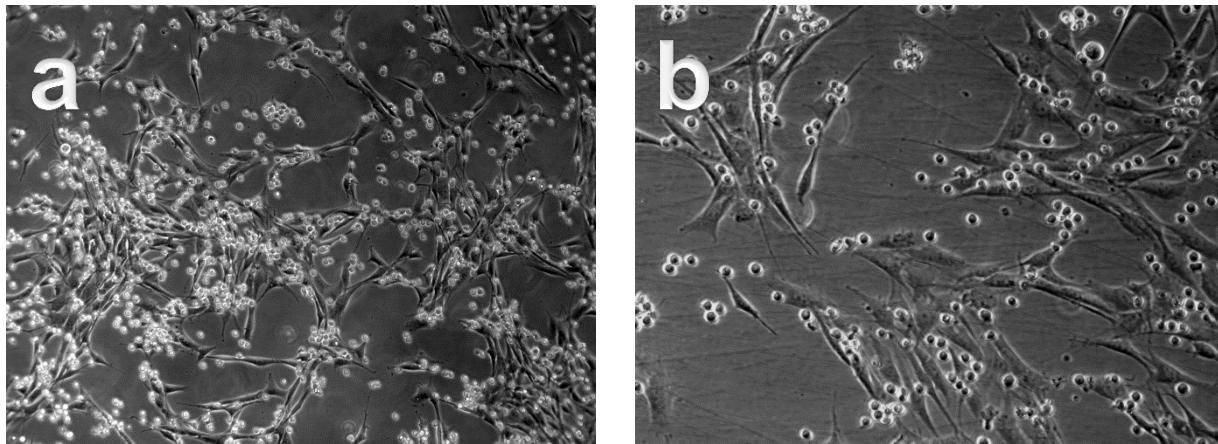
**Abbildung 2a/b: Adhäsente Feeder Layer Zellen**

Hier sind adhäsente Feeder Layer Zellen dargestellt. Abbildung 2a wurde in 50-facher, Abbildung 2b in 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

Nun wurden erneut Feeder Layer Zellen bestrahlt und in einer Konzentration von  $0,75 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> auf neue Kulturflaschen verteilt. Die bereits für 48 Stunden auf Feeder Layer inkubierten MCL- und ALL-Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert, in RPMI-Medium resuspendiert und in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  cells/ml zum frischen Feeder Layer in den neuen Kulturflaschen hinzugegeben.

Im Anschluss wurden in 3 unabhängigen Experimenten jeweils unbehandelte MCL- und ALL-Zellen auf dem Feeder Layer kultiviert. Dies wurde ebenfalls mit in Mono- und Kombinations-Therapie (siehe 4.2) behandelten MCL- und ALL-Zellen

durchgeführt. Nach einer Inkubation für 72 Stunden erfolgte die Zell-Quantifizierung durch das Vi-CELL Zellzählgerät.



**Abbildung 3a/b: BALL-1 auf adhärenten Feeder Layer Zellen**

In Abbildung 3a und 3b sind ALL-Zellen der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 auf adhärenten Feeder Layer Zellen dargestellt. Die ALL-Zellen finden sich hier hauptsächlich gruppiert entlang der Feeder Layer Zellen. Abbildung 3a wurde bei 50-facher, Abbildung 3b bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

## 4.3 Zellquantifizierung

### 4.3.1 Trypanblau-Ausschlusstest

Beim Trypanblau-Ausschlusstest handelt es sich um eine einfache Methode zur Bestimmung der Zelldichte einer Zellsuspension. Zusätzlich können lebende von apoptotischen Zellen unterschieden werden, denn der Test beruht auf der veränderten Membrandurchlässigkeit apoptotischer Zellen. Trypanblau ist ein anionischer Farbstoff der von lebenden Zellen mit einer intakten Zellmembran kaum aufgenommen und zusätzlich durch aktiven Transport wieder aus dem Zellinneren herausgepumpt wird. Apoptotische Zellen Färben sich hingegen blau an. Die Zellzählung wird mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wie folgt durchgeführt:

10 µl Zellsuspension werden mit 10 µl Trypanblau vermischt, anschließend werden die Zellen in den 4 Großquadranten der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Die Zelldichte wird dann nach dieser Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \left( \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{2} \right) \times 10^4$$

Auch der prozentuale Anteil der lebenden Zellen kann errechnet werden:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen} \times 100}{(\text{ungefärbte} + \text{gefärbte Zellen})}$$

### 4.3.2 Vi-CELL Zellzählgerät

Die Methode der Wahl zur Quantifizierung und Messung der Zellviabilität in dieser Arbeit war die Zellzählung mittels Vi-CELL. Es handelt sich dabei um ein automatisiertes Zellzählgerät, welches die Zellzahl mit Hilfe eines Durchflusszytometers und die Zellviabilität mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstests bestimmt.

Zur Messung werden 0,5 ml der Zellsuspension durch das Zählgerät aspiriert und mit Trypanblau gemischt. Anschließend werden bis zu 100 Einzelaufnahmen im Druchflusszytometer des Vi-CELL gemacht und direkt analysiert wieviele Zellen Trypanblau aufgenommen haben. Die Anzahl der viablen Zellen, die Viabilität und die absolute Zellzahl können so automatisch errechnet werden.

### 4.3.3 Versuchsaufbau

In dieser Arbeit wurden 6 verschiedene MCL-Zelllinien (Granta 519, JeKo-1, MAVER-1, Mino, Rec-1, Z-138), die ALL-Zelllinie BALL-1 (Vergleichs-Zelllinie), 4 Zytostatika (Bendamustin (B), Cisplatin (C), Cytarabin (A), Dexamethason (D)) und 3 Inhibitoren (Ibrutinib (Ibru), Idelalisib (Cal), Temsirolimus (Tem)) verwendet. Es wurden stets 3 voneinander unabhängige Versuchsansätze durchgeführt und so die Mittelwerte und Standardabweichungen der erhaltenen Daten errechnet.

#### 1) Dosisfindung:

Zuerst wurde mit jedem der genannten Medikamente für alle Zelllinien eine Dosisfindung durchgeführt. Dazu wurden die Medikamente in absteigenden Konzentrationen verdünnt und die MCL- und ALL-Zellen für insgesamt 72 Stunden mit dem jeweiligen Therapeutikum inkubiert. In jedem der Experimente wurden außerdem auch unbehandelte Zellen als Bezugswert für 72 Stunden kultiviert. Die Zelldichte war zum Versuchsbeginn standardisiert bei  $0,5 \times 10^6$  cells/ml und wurde bei behandelten und unbehandelten Zellen erneut nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-CELL gemessen. Als Standarddosis für das jeweilige Medikament wurde dann diejenige Konzentration ausgewählt, bei welcher die Zelldichte nach 72 Stunden ca. 50-60% der Zelldichte der unbehandelten MCL- oder ALL-Zellen betrug.

## 2) Proliferationsassay:

Die Zellen aller Zelllinien (MCL und ALL) wurden für 72 Stunden mit den Medikamenten in der jeweils ermittelten Standarddosis behandelt (Monotherapie). Gleichzeitig wurden ebenfalls unbehandelte Zellen für 3 Tage kultiviert. Die Zelldichte an Tag 0 für behandelte und unbehandelte Zellen betrug erneut  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml und es wurden Vi-CELL-Analysen nach 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt. So konnte die in vitro Wirksamkeit der eingesetzten Therapeutika und das Ansprechen der verschiedenen Zelllinien auf die Therapie bei gleicher Dosis zu unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen werden.

## 3) Kombinationsassay:

Hierbei wurden die Zellen wie oben beschrieben mit der Monotherapie behandelt, unbehandelte Zellen als Kontrolle kultiviert, und zusätzlich Kombinations-Therapien mit jeweils einem der Inhibitoren und einem Zytostatikum durchgeführt. So ergaben sich folgende Kombinationen der Therapeutika:

- Ibru/A, Ibru/B, Ibru/C, Ibru/D
- Cal/A, Cal/B, Cal/C, Cal/D
- Tem/A, Tem/B, Tem/C, Tem/D

Es fanden ebenfalls Experimente mit Kombinations-Therapien der Inhibitoren statt:

- Ibru/Cal
- Ibru/Tem
- Cal/Tem

Somit konnte ermittelt werden, wie stark die Zellproliferation durch die verschiedenen Kombinations-Therapien, im Vergleich zu den Monotherapien und im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, eingeschränkt wurde.

### 4.3.4 Fraction of Product

Um den Effekt der Kombinations-Therapien zu ermitteln, und um herauszufinden ob die kombinierten Medikamente synergistisch, additiv oder antagonistisch wirken, wurde anschließend die „Fraction of Product“ mit Hilfe dieser Formel nach Webb berechnet. [121]

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

Die „Fraction affected“ (FA) entspricht hierbei der prozentualen Zellzahlverminderung einer behandelten Probe bezogen auf die unbehandelten Kontroll-Zellen

nach 72 Stunden. „Substanz X und Y“ sind Bezeichnungen für Monotherapien mit 2 verschiedenen Medikamenten und „Kombination X+Y“ steht für die Kombinations-Therapie der beiden verwendeten Substanzen.

Ergebnisse  $\geq +0,1$  werden als therapeutischer Synergismus bewertet, bei Werten  $\leq -0,1$  handelt es sich um antagonistische Effekte der verwendeten Substanzen. Von einer additiven Wirkung zweier kombinierter Medikamente kann bei Ergebnissen ausgegangen werden welche zwischen +0,1 und -0,1 liegen.

## 4.4 FACS-Analysen

### 4.4.1 Apoptose Detektion mit Annexin V-FITC- und Propidiumiodid-Färbung

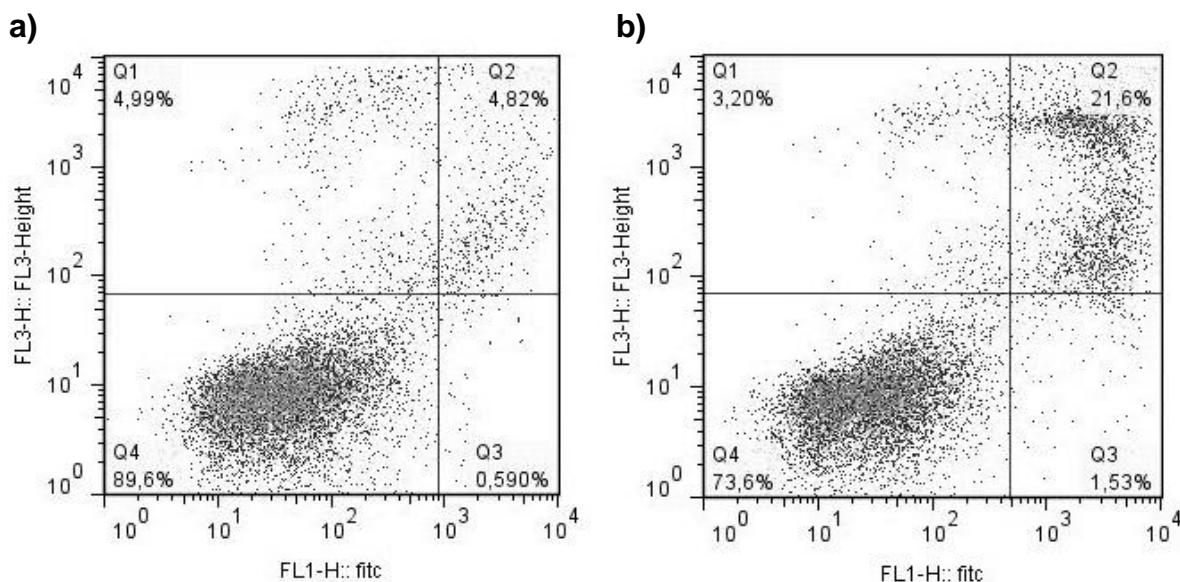
Die Apoptose wurde bei den MCL- und ALL-Zellen 48 Stunden nach Therapie mit den eingesetzten Inhibitoren und Zytostatika detektiert.

Versuchsdurchführung:

- Behandelte Zellen 2 mal mit PBS waschen
- Mit Bindungspuffer (10x Annexin V Binding Buffer) resuspendieren
- 100 µl der Lösung in ein 5 ml Tube geben
- 5 µl Annexin V-FITC und 5 µl Propidiumiodid (PI) hinzugeben
- 15min bei Raumtemperatur (RT) im Dunklen inkubieren
- 400 µl Bindungspuffer hinzufügen
- Direkt durchflusszytometrisch analysieren

Hierfür wurde das „Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I“ von BD Biosciences Pharmingen eingesetzt. Der Versuch beruht auf den Veränderungen der Zellen die diese charakteristischerweise beim programmierten Zelltod, der Apoptose, durchlaufen. Es kommt einerseits zum Verlust der physiologischen Asymmetrie der Plasmamembran und des Membranpotentials. Dies führt dazu, dass das negativ geladene Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der Membraninnen- auf die Außenseite gelangt und so der Umgebung der Zelle präsentiert wird. Andererseits erfolgt Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung und im späteren Verlauf der Apoptose kommt es zum Verlust der Membran-Integrität, was zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Plasmamembran führt. [122] Annexin V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu PS. Es bindet daher an die Membranaußenseite apoptotischer Zellen, sobald PS dort durch den

beginnenden Zelltod exponiert wird. Des Weiteren kann FITC, ein Fluorochrom, an Annexin V gebunden werden, die Fluoreszenz von Annexin V-FITC kann dann durchflusszytometrisch gemessen werden. Die Zelfärbung mit Propidiumiodid (PI) ist nötig um früh- von spät-apoptotischen Zellen zu unterscheiden. PI wird ausschließlich von spät-apoptotischen Zellen mit einer gestörten Membran-Integrität aufgenommen. In der FACS-Analyse können mit Hilfe der Doppelfärbung früh-(Annexin V-FITC positiv, PI negativ) von spät-apoptotischen Zellen (Annexin V-FITC positiv, PI positiv) unterschieden werden. Intakte vitale Zellen zeigen sich hingegen Annexin V-FITC und PI negativ. [122] Im Folgenden sind zur Veranschaulichung FACS-Daten der MCL-Zelllinie Rec-1 dargestellt.



**Abbildung 4a/b: Dot Plots Apoptose FACS**

Exemplarische Darstellung von Apoptose-Dot Plots der MCL-Zelllinie Rec-1.

In Abbildung 4a sieht man die Apoptose Daten unbehandelter Zellen. Abbildung 4b zeigt die Zellen nach einer Behandlung mit einer Kombination von Ibrutinib und Dexamethason (Ibru/D) für 48 Stunden. Im Feld Q2 finden sich jeweils die spät-apoptotischen, in Q3 die früh-apoptotischen und in Q4 die lebenden Zellen.

In Fluoreszenzkanal FL1 des Druchflusszytometers wurde die Fluoreszenz von Annexin-FITC und in Fluoreszenzkanal FL3 von Propidiumiodid gemessen. Es wurden mindestens 10000 Zellen analysiert. Bei den unbehandelten Kontroll-Zellen wurden insgesamt 5,4% (0,6% früh-, 4,8% spät-apoptotisch) apoptotische Zellen detektiert (Abb. 4a), nach Kombinations-Therapie mit Ibru/D waren es 23,1% (1,5% früh-, 21,6% spät-apoptotisch) der analysierten Zellen (Abb. 4b).

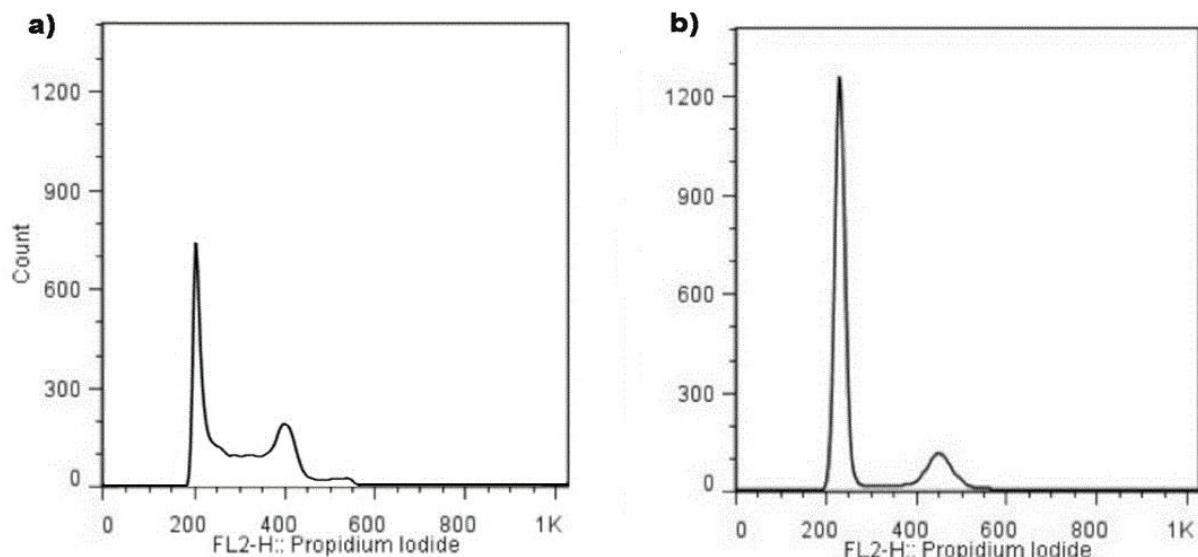
#### 4.4.2 Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid Färbung

Zusätzlich wurden Analysen des Zellzyklus bei unbehandelten Zellen und 48 Stunden nach Behandlung mittels Durchflusszytometer wie folgt durchgeführt:

Versuchsdurchführung:

- 200000 behandelte Zellen zentrifugieren und in PBS waschen
- In 70%-igem Ethanol fixieren
- 30min bei 4°C inkubieren
- 2 mal mit PBS waschen
- 50 µl Ribonuklease hinzufügen
- 200 µl Lysis-Puffer hinzugeben
- Durchflusszytometrisch analysieren

Propidiumiodid ist ein fluoreszierender Farbstoff welcher in die DNA interkaliert. Die Fixierung der MCL-Zellen in Ethanol ermöglicht, dass PI ins Zellinnere eindringen kann, die Behandlung mit Ribonuklease verhindert eine falsch hohe Fluoreszenz durch Interkalation in vorhandene RNA. Die Zellzyklusanalyse beruht auf dem unterschiedlichen DNA-Gehalt während der Zellzyklus-Phasen. In der G1-Phase findet sich ein einfacher Chromosomensatz, in der G2/M-Phase hingegen ein doppelter. Daher ist die gemessene Fluoreszenz bei Zellen in der G2/M-Phase um das 2-fache erhöht. Bei S-Phase-Zellen liegt die Fluoreszenz-Intensität zwischen der Intensität der G1- (1-fach) und der G2/M-Phase (2-fach). Bei der Messung im Fluoreszenzkanal FL2 des Durchflusszytometers werden mindestens 10000 Zellen analysiert. In Abb. 5 sind Zellzyklus-Histogramme der MCL-Zelllinie Rec-1 gezeigt. Auf der X-Achse findet sich die gemessene Fluoreszenz-Intensität von Propidiumiodid, auf der Y-Achse die Anzahl der detektierten Ereignisse (Count).



**Abbildung 5a/b: Zellzyklus FACS**

Exemplarische Darstellung von Zellzyklus-Histogrammen der MCL-Zelllinie Rec-1.

In Abbildung 5a sieht man die Zellzyklus Daten unbehandelter Zellen. Abbildung 5b zeigt die Zellen nach einer Behandlung mit einer Kombination von Ibrutinib und Temsirolimus (Ibru/Tem) für 48 Stunden. Der erste Peak steht jeweils für Zellen in der G1-Phase, der zweite Peak für Zellen in der G2/M-Phase, die Fläche unter der Kurve zwischen den beiden Peaks steht für die Zellen die sich in der S-Phase der Zellzyklus befinden.

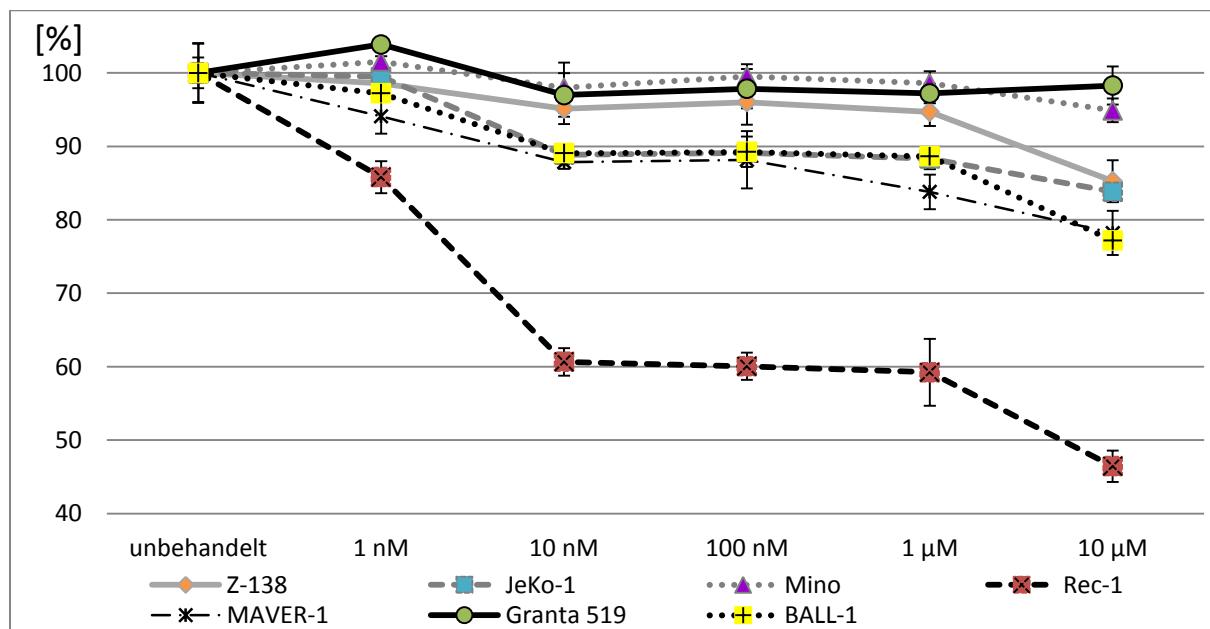
Nach einer Behandlung mit Ibru/Tem zeigte sich ein Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus (erster Peak = G1-Phase, zweiter Peak = G2/M-Phase, Fläche unter der Kurve zwischen Peak 1 und 2 = S-Phase).

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Ibrutinib

#### 5.1.1 Dosisfindung

Für diese Arbeit wurde eine Dosis von 10 nM Ibrutinib zur in vitro Therapie der MCL- und ALL-Zellen etabliert. Hierfür wurden alle 7 Zelllinien (Granta 519, JeKo-1, MAVER-1, Mino, Rec-1, Z-138 und BALL-1) mit verschiedenen Dosierungen des Medikaments für 72 Stunden behandelt und die Proliferationshemmung im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Zellen der jeweiligen Zelllinie beurteilt. Die verwendeten Dosierungen waren 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM und 10 µM. Um die Änderungen des Zellwachstums durch die Therapie ersichtlich zu machen wurden die unbehandelten und die behandelten Zellen mittels Vi-CELL nach 72 Stunden ausgezählt und verglichen.



**Abbildung 6: Dosisfindung für Ibrutinib bei allen Zelllinien**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse sind die verwendeten Dosierungen von Ibrutinib in ansteigender Reihenfolge (1 nM – 10 µM) aufgetragen. Zudem finden sich hier die jeweils unbehandelten Kontroll-Zellen der verwendeten Zelllinien Z-138, JeKo-1, Mino, Rec-1, MAVER-1, Granta 519 und BALL-1. Alle Zelllinien wurden für 72 Stunden mit Ibrutinib in den genannten Dosierungen behandelt.

Hierbei zeigte sich, dass die Zellen der Zelllinien Granta 519 und Mino bei keiner der verwendeten Dosierungen sensibel auf Ibrutinib reagierten. Bei Z-138 war lediglich in der höchsten Dosierung von 10 µM eine Wachstumshemmung von 14,7% ±2,9 im

Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachweisbar. Granta 519, Mino und Z-138 wurden daher als resistente Zelllinien eingestuft.

JeKo-1, MAVER-1 und die Vergleichs-Zelllinie BALL-1 zeigten ab der Dosis von 10 nM eine um mehr als 10% eingeschränkte Proliferation und gelten daher als sensible Zelllinien (Wachstumshemmung bei 10 nM Ibrutinib: JeKo-1 11,1%  $\pm$ 1,2; MAVER-1 12,2%  $\pm$ 0,9, BALL-1 10,9%  $\pm$ 0,9).

Als mit Abstand sensibelste Zelllinie erwies sich Rec-1, hier fand bei jeder der verwendeten Dosierungen eine deutliche Proliferationshemmung statt. Bei der für alle folgenden Versuche festgelegten Dosis von 10 nM Ibrutinib war das Wachstum bei Rec-1 um 39,4%  $\pm$ 1,9 geringer als bei der unbehandelten Kontrolle. Bei allen sensiblen MCL-Zelllinien (JeKo-1, MAVER-1, Rec-1) und der ebenfalls sensiblen Vergleichs-Zelllinie BALL-1 konnte eine dosisabhängige Proliferationshemmung durch Ibrutinib gezeigt werden.

### **5.1.2 Wachstumskurven bei 10 nM**

Um beurteilen zu können ob Ibrutinib zusätzlich zur dosis- auch eine zeitabhängige Proliferationshemmung auslöst, wurden alle Zelllinien für insgesamt 72 Stunden mit 10 nM therapiert. Das Zellwachstum wurde bei unbehandelten Kontroll-Zellen der jeweiligen Zelllinie und bei den behandelten Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-CELL ermittelt.

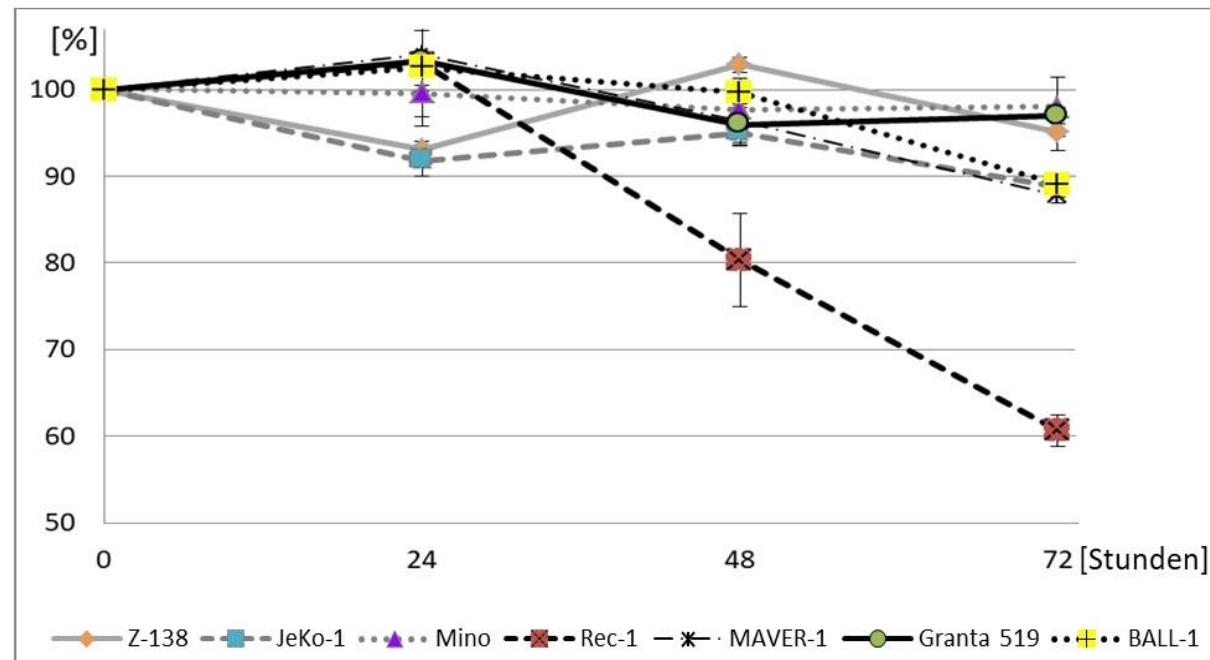
Hierbei zeigte sich besonders bei der sensiblen Zelllinie Rec-1 eine zeitabhängige Proliferationshemmung durch Ibrutinib. Das Zellwachstum war nach 24 stündiger Therapie noch nicht, nach 48 Stunden um 19,7%  $\pm$ 5,4 und nach 72 Stunden um 39,4%  $\pm$ 1,9 eingeschränkt.

Bei den anderen als sensibel eingestuften Zelllinien JeKo-1, MAVER-1 und BALL-1 konnte nach 72 Stunden ein verringertes Zellwachstum festgestellt werden. BALL-1 und MAVER-1 zeigten nach 24 oder 48 Stunden Therapie mit 10 nM Ibrutinib noch keine eingeschränkte Proliferation, nach 72 Stunden war das Zellwachstum bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 um 10,9%  $\pm$ 0,9 und bei MAVER-1 um 12,2%  $\pm$ 0,9 eingeschränkt. JeKo-1 zeigte ein um 8,2%  $\pm$ 1,8 verringertes Wachstum nach 24, um 4,9%  $\pm$ 1,4 nach 48 und um 11,1%  $\pm$ 1,2 nach 72 Stunden.

Die resistenten Zelllinien Granta 519, Mino und Z-138 zeigten nach 48 und nach 72 Stunden keine Änderung im Zellwachstum verglichen mit den unbehandelten Zellen. Bei Z-138 konnte nach 24 Stunden eine um 6,9%  $\pm$ 0,9 verminderte Proliferation

ermittelt werden, nach 48 und 72 Stunden war dieser Effekt aber nicht mehr ersichtlich und die Proliferation nicht weiter eingeschränkt.

Die Wachstumskurven aller Zelllinien sind in Abb. 7 dargestellt.



**Abbildung 7: Wachstumskurven bei Therapie mit 10 nM Ibrutinib**

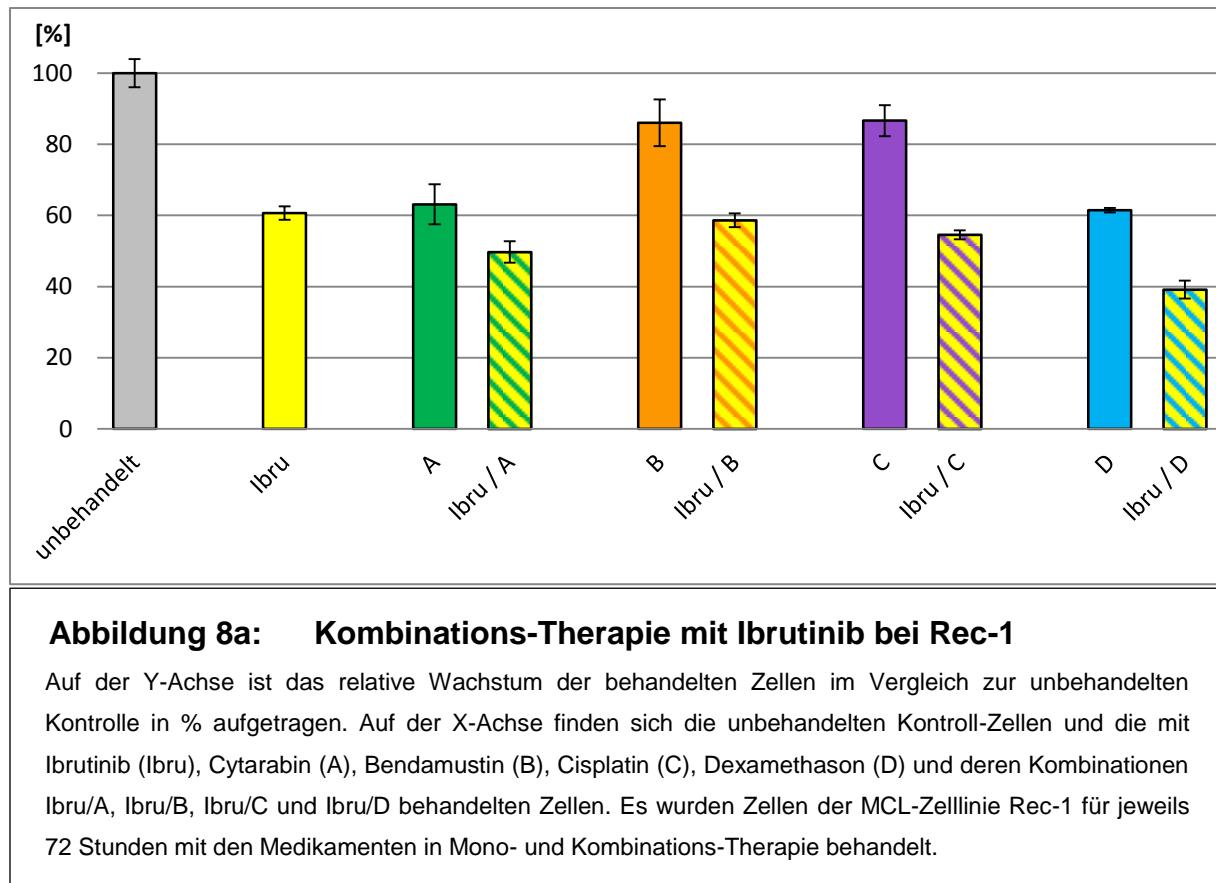
Auf der Y-Achse ist das relative Zellwachstum im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse ist die Dauer der Behandlung mit 10 nM Ibrutinib in Stunden aufgetragen. Gezeigt sind die Wachstumskurven der MCL-Zelllinien Z-138, JeKo-1, Mino, Rec-1, MAVER-1, und Granta 519 und der ALL-Zelllinie BALL-1.

### 5.1.3 Kombinationsassays

#### 5.1.3.1 Kombinations-Therapie

In der Therapie des Mantelzell-Lymphoms werden in der Regel mehrere Therapeutika miteinander kombiniert. Ibrutinib wurde daher in dieser Arbeit mit 4 Medikamenten (Cytarabin, Bendamustin, Cisplatin, Dexamethason) aus unterschiedlichen bereits etablierten MCL-Therapie-Regimen kombiniert. Es sollte ermittelt werden, ob der BTK-Inhibitor bei gleichzeitiger Gabe eines der anderen Medikamente weiterhin wirksam ist. Ferner ob die Kombinations-Therapie additiv oder gegebenenfalls sogar synergistisch wirkt, oder ob sich antagonistische Effekte zeigen.

Im Folgenden wird die Kombinations-Therapie mit Ibrutinib anhand der sensiblen Zelllinien Rec-1 (MCL) und BALL-1 (ALL) im Vergleich gezeigt.



**Abbildung 8a: Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei Rec-1**

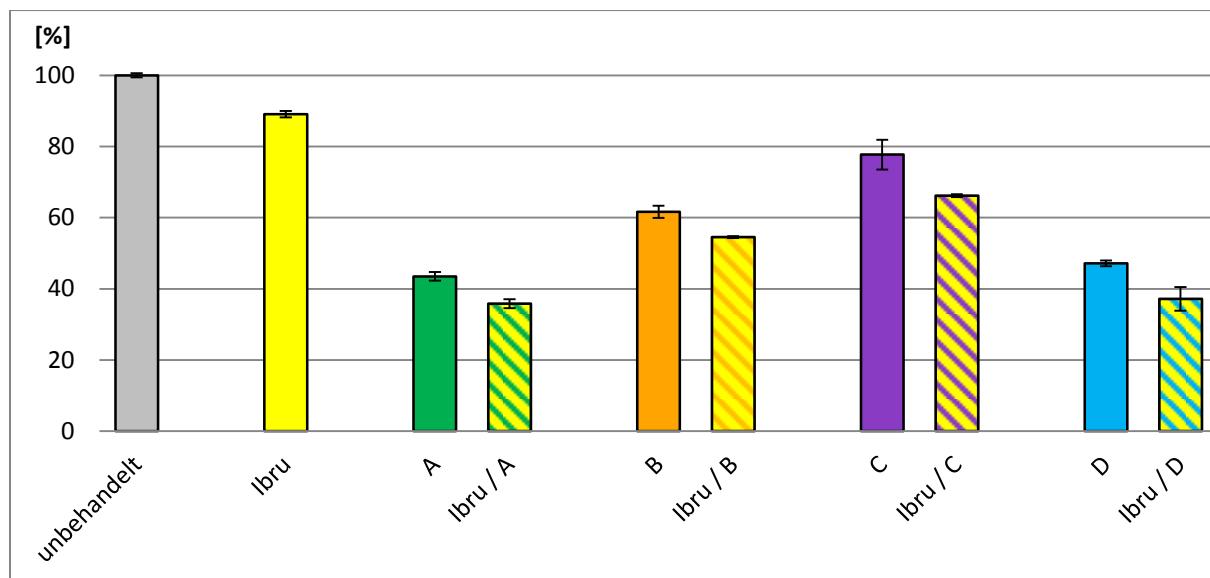
Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Ibru/A, Ibru/B, Ibru/C und Ibru/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinie Rec-1 für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

In Abb. 8a werden die Ergebnisse der Kombinations-Therapie anhand der sensiblen MCL-Zelllinie Rec-1 dargestellt. Rec-1 reagierte ebenfalls sensibel auf die Monotherapie mit 2,5 ng/ml Cytarabin (Wachstumshemmung: 36,9%  $\pm$ 5,6), 5  $\mu$ g/ml Bendamustin (Wachstumshemmung: 14,0%  $\pm$ 6,6), 1  $\mu$ M Cisplatin (Wachstums-hemmung: 13,4%  $\pm$ 4,4) und 1 mM Dexamethason (Wachstumshemmung: 38,5%  $\pm$ 0,6). Die Therapie mit 10 nM Ibrutinib führte bei den MCL-Zellen zu einer Proliferationseinschränkung von 39,4%  $\pm$ 1,9, in der Kombination mit Cytarabin (Ibru/A) war das Zellwachstum um 50,3%  $\pm$ 3,0, mit Bendamustin (Ibru/B) um 41,4%  $\pm$ 1,9, mit Cisplatin (Ibru/C) um 45,4%  $\pm$ 1,3 und mit Dexamethason (Ibru/D) um 60,9%  $\pm$ 2,5 vermindert.

Für die eingesetzten Chemotherapeutika wurden im Vorfeld ebenfalls Experimente zur Dosisfindung durchgeführt. Hierfür wurden alle 7 Zelllinien (Granta 519, JeKo-1, MAVER-1, Mino, Rec-1, Z-138 und BALL-1) mit verschiedenen Dosierungen der Medikamente behandelt. Die Proliferationshemmung im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Zellen der jeweiligen Zelllinie wurde nach 72 Stunden mittels Vi-CELL beurteilt. Die Dosis der Chemotherapeutika, die bei den Zelllinien eine

Proliferationshemmung von 20-40% nach 72 Stunden erbrachte, wurde so ermittelt und für die weiteren Versuche eingesetzt.

In Abb. 8b wird die Kombinations-Therapie anhand der sensiblen ALL-Zelllinie BALL-1 dargestellt.



**Abbildung 8b: Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei BALL-1**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Ibru/A, Ibru/B, Ibru/C und Ibru/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der ALL-Zelllinie BALL-1 für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

BALL-1 zeigte sich in der Monotherapie ebenfalls sensibel auf die Zytostatika-Behandlung mit 2,5 ng/ml Cytarabin (Wachstumshemmung:  $56,5\% \pm 1,2$ ), mit 5 µg/ml Bendamustin (Wachstumshemmung:  $38,3\% \pm 1,7$ ), mit 1 µM Cisplatin (Wachstumshemmung:  $22,3\% \pm 4,2$ ) und mit 1 mM Dexamethason (Wachstumshemmung:  $52,8\% \pm 0,8$ ).

Die kombinierte Gabe der Zytostatika mit 10 nM Ibrutinib schränkte die Proliferation noch zusätzlich ein. Mit einer Kombination aus Cytarabin und Ibrutinib (Ibru/A) ergab sich eine Wachstumshemmung von  $64,2\% \pm 1,3$ , mit Bendamustin und Ibrutinib (Ibru/B) von  $45,5\% \pm 0,3$ , mit Cisplatin und Ibrutinib (Ibru/C) von  $33,8\% \pm 0,4$  und mit der Kombination aus Dexamethason und Ibrutinib (Ibru/D) wurde die Proliferation um  $62,9\% \pm 3,3$  verringert.

Insgesamt ist der Effekt der Kombinations-Therapie bei der MCL-Zelllinie Rec-1 stärker ausgeprägt als bei der ALL-Vergleichszelllinie BALL-1.

Die Medikamenten-Kombinationen Ibru/B, Ibru/C und Ibru/D erwiesen sich bei Rec-1 durch die Errechnung der Fraction of Product als additiv. Die Kombinations-Therapie Ibru/A ergab hingegen einen gering antagonistischen Effekt. Alle Medikamenten-Kombinationen zeigten bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 ebenfalls additive Effekte. In Tabelle 5 werden die Fraction of Product-Ergebnisse aller Zelllinien (MCL und ALL) für die Kombinations-Therapie mit Ibrutinib dargestellt.

	Ibru/A	Ibru/B	Ibru/C	Ibru/D
Z-138	0,06	- 0,06	0,00	0,00
JeKo-1	- 0,08	<b>- 0,18</b>	<b>- 0,15</b>	- 0,05
Mino	0,02	0,04	0,01	<b><u>0,10</u></b>
Rec-1	<b>- 0,11</b>	- 0,06	- 0,02	- 0,02
MAVER-1	- 0,07	- 0,09	- 0,04	- 0,05
Granta 519	- 0,06	<b>- 0,12</b>	- 0,06	0,00
BALL-1	0,03	0,00	0,03	0,05

**Tabelle 5: Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib**

Normal gedruckte Werte zeigen additive Effekte der Kombination an, fett gedruckte Werte einen Antagonismus. Werte die fett und unterstrichen gedruckt sind zeigen einen synergistischen Effekt.

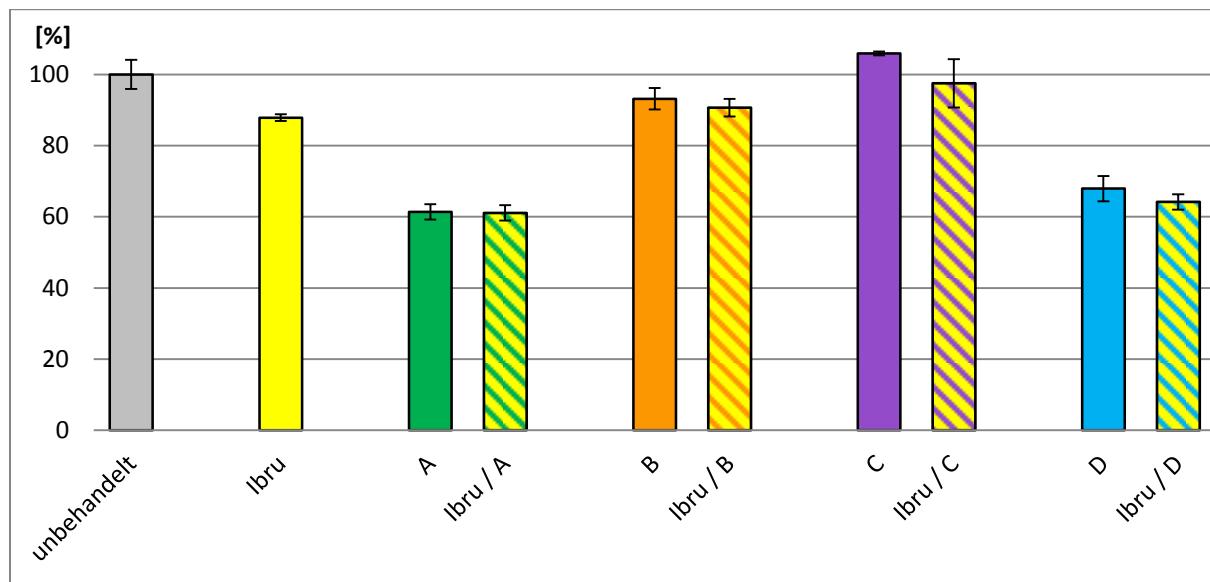
Hierbei zeigte sich für die Kombination von Ibrutinib und Cytarabin (Ibru/A) bis auf Rec-1 in 6 von 7 Zelllinien ein additiver Effekt. Ibru/B war bis auf JeKo-1 und Granta in 5 von 7 Zelllinien additiv. Ibru/C zeigte bis auf JeKo-1 additive Effekte in 6 von 7 Zelllinien. Die Medikamente Ibrutinib und Dexamethason wirkten in Kombination bei allen Zelllinien additiv, bei Mino sogar grenzwertig synergistisch.

### 5.1.3.2 Kombinations-Therapie ohne und mit Feeder Layer

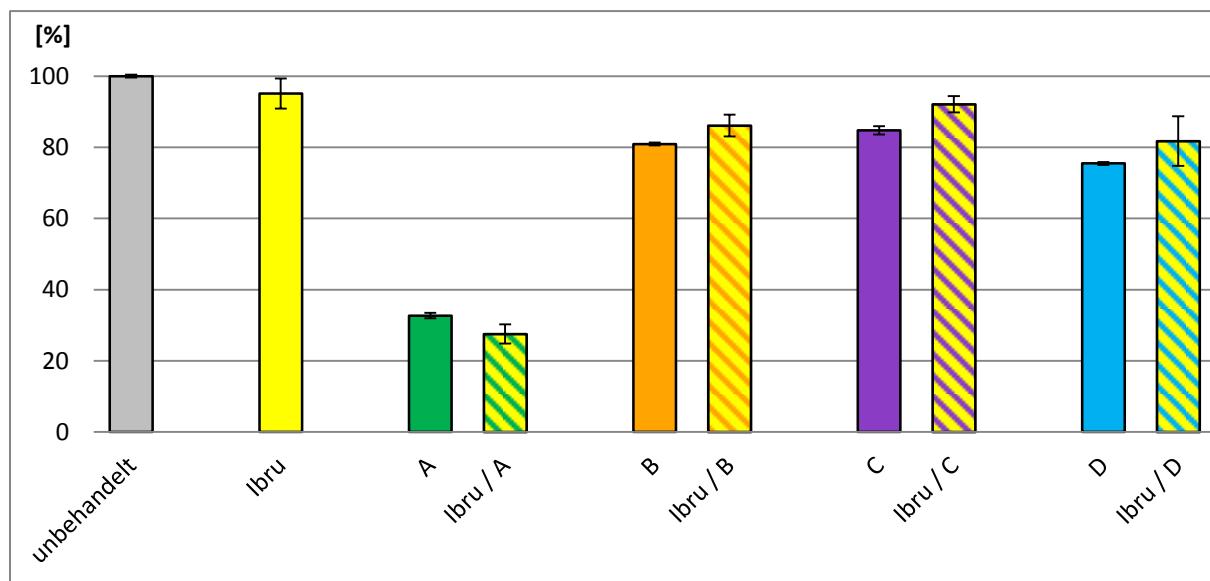
Mit den beiden sensiblen Zelllinien MAVER-1 (MCL) und BALL-1 (ALL) wurden in dieser Arbeit noch weitere Experimente auf Feeder Layer Zellen durchgeführt. So sollte beurteilt werden, ob eine Aktivierung der Zellen durch die Wachstumsfaktoren des Feeder Layers zu veränderten therapeutischen Effekten von Ibrutinib in der Mono- und Kombinations-Therapie führt.

Die Kombinations-Therapie mit Ibrutinib ohne und mit Feeder Layer wird in Abb. 9 anhand der MCL-Zelllinie MAVER-1 dargestellt.

(a)



(b)



**Abbildung 9a/b: Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei MAVER-1 ohne und mit Feeder Layer**

Abb. 9a zeigt die Kombinations-Therapie ohne, Abb. 9b die Kombinations-Therapie mit Feeder Layer. Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Ibru/A, Ibru/B, Ibru/C und Ibru/D behandelten Zellen. Es wurden MCL-Zellen der Zelllinie MAVER-1 (auf Feeder Layer Zellen) kultiviert und für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

In der Kombinations-Therapie ohne Feeder Layer (Abb. 9a) zeigte sich nach Ibrutinib-Monotherapie eine um  $12,2\% \pm 0,9$  verringerte Wachstumsrate. Die Cytarabin-Monotherapie führte zu einem um  $38,6\% \pm 2,2$ , Ibru/A zu einem um  $38,9\%$

$\pm 2,2$  eingeschränkten Wachstum. Nach der Behandlung mit Bendamustin ergab sich eine Proliferationseinschränkung von  $6,9\% \pm 3,0$  und nach Ibru/B von  $9,4\% \pm 2,5$ . Weder Cisplatin noch Ibru/C führte zu einer Wachstumsreduktion. Die Dexamethason-Monotherapie erzielte eine relative Zellzahlreduktion von  $32,1\% \pm 3,5$  und in Kombination mit Ibrutinib (Ibru/D) von  $35,8\% \pm 2,2$ .

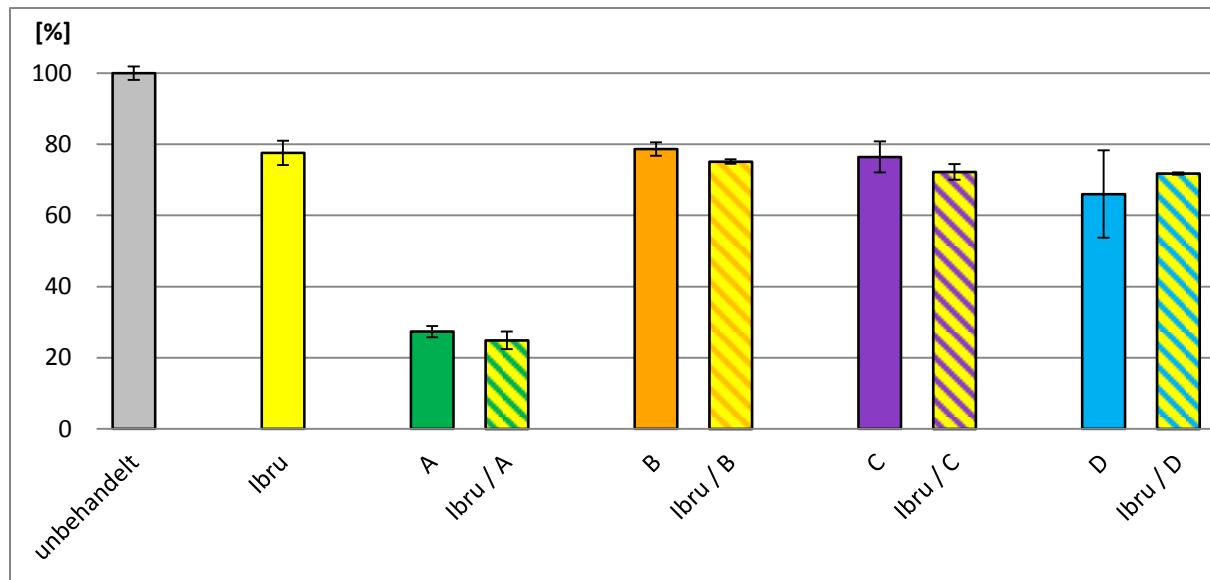
Bei den Kombinations-Versuchen auf Feeder Layer (Abb. 9b) zeigte sich nach der Behandlung mit Ibrutinib sich ein um nur  $4,9\% \pm 4,2$  verringertes Zellwachstum im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen. Die Monotherapie mit Cytarabin zeigte eine um  $67,3\% \pm 0,8$  und die Kombination von Cytarabin und Ibrutinib (Ibru/A) zeigte eine um  $72,5\% \pm 2,7$  verringerte Proliferation. Die Monotherapie mit Bendamustin führte zu einer Wachstumshemmung von  $19,1\% \pm 0,4$ , die Kombinations-Therapie mit Ibrutinib zu einer Wachstumshemmung von  $13,9\% \pm 3,1$ . Cisplatin erzielte eine relative Zellzahlreduktion von  $15,3\% \pm 1,2$  und in Kombination mit Ibrutinib (Ibru/C) von  $7,9\% \pm 2,3$ . Durch die Therapie mit Dexamethason konnte das Zellwachstum um  $24,5\% \pm 0,4$  verringert werden, zusammen mit Ibrutinib (Ibru/D) um  $18,3\% \pm 6,9$ .

Jedoch wurden für die Versuche die im Überstand befindlichen Zellen verwendet, welche somit wenig oder keinen direkten Kontakt zum Feeder Layer hatten. Die Ergebnisse müssen daher mit Vorsicht interpretiert werden.

Die Ergebnisse der Kombinations-Therapie bei BALL-1 ohne Feeder Layer wurden bereits unter 5.1.3.1 beschrieben und in Abb. 8b dargestellt.

Die Effekte der Kombinations-Therapie mit Ibrutinib auf Feeder Layer werden bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 in Abb. 9c gezeigt.

Hier ergab sich in der Monotherapie mit Ibrutinib eine um  $22,4\% \pm 3,5$  verringerte Wachstumsrate im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen. Cytarabin erzielte eine relative Zellzahlreduktion von  $72,7\% \pm 1,6$  und in Kombination mit Ibrutinib (Ibru/A) von  $75,1\% \pm 2,5$ . Die Monotherapie mit Bendamustin zeigte eine um  $21,3\% \pm 1,9$  und die Kombination von Bendamustin und Ibrutinib (Ibru/B) eine um  $24,9\% \pm 0,6$  verringerte Proliferation. Die Monotherapie mit Cisplatin führte zu einer Wachstumshemmung von  $23,6\% \pm 4,4$ , die Kombinations-Therapie mit Ibrutinib zu einer Wachstumshemmung von  $27,8\% \pm 2,2$ . Durch die Therapie mit Dexamethason konnte das Zellwachstum um  $34,0\% \pm 12,3$  verringert werden, zusammen mit Ibrutinib um  $28,2\% \pm 0,3$ .



**Abbildung 9c: Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei BALL-1 auf Feeder Layer**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Ibru/A, Ibru/B, Ibru/C und Ibru/D behandelten Zellen. Es wurden ALL-Zellen der Zelllinie BALL-1 auf Feeder Layer Zellen kultiviert und für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

In Tabelle 6 werden die Ergebnisse der Fraction of Product-Berechnung nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib ohne und mit Feeder Layer gezeigt.

	Ibru/A	Ibru/B	Ibru/C	Ibru/D
MAVER-1	- 0,07	- 0,09	- 0,04	- 0,05
BALL-1	0,03	0,00	0,03	0,05
MAVER-1	0,04	- 0,09	<b>- 0,12</b>	<b>- 0,10</b>
BALL-1	- 0,04	<b>- 0,14</b>	<b>- 0,13</b>	<b>- 0,21</b>

**Tabelle 6: Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib ohne und mit Feeder Layer**

Normal gedruckte Werte zeigen einen Additivismus der verwendeten Medikamentenkombination, fett gedruckte Werte zeigen einen Antagonismus. Weiß hinterlegt sind die Ergebnisse der Versuche ohne Feeder Layer, die Ergebnisse mit Feeder Layer sind hellblau hinterlegt.

Durch die Errechnung der Fraction of Product nach Kombinations-Therapie auf Feeder Layer ergab sich für die MCL-Zelllinie MAVER-1 bei den Kombinationen von

Ibrutinib mit Cytarabin und Bendamustin ein additiver Effekt. Die beiden anderen Medikamenten-Kombinationen führten zu antagonistischen Effekten. Für die ALL-Zelllinie BALL-1 ergab sich ausschließlich bei der Kombination von Ibrutinib und Cytarabin ein additiver Effekt. Die restlichen Medikamenten-Kombinationen führten zu Antagonismen.

Im Vergleich dazu ergaben sich bei MAVER-1 und BALL-1 ohne Feeder Layer in allen Kombinationen additive Effekte.

Insgesamt scheint der Effekt von Ibrutinib auf Feeder Layer weniger stark ausgeprägt zu sein. Die verwendeten Zytostatika zeigen auf Feeder Layer weiterhin Wirksamkeit.

## 5.1.4 FACS-Analysen

### 5.1.4.1 Apoptose

In dieser Arbeit wurden des Weiteren FACS-Analysen mit den Zelllinien Rec-1 und BALL-1 durchgeführt. Nach der Therapie der MCL- und ALL-Zellen für 48 Stunden wurden diese im Durchflusszytometer analysiert und in lebende, früh- und spät-apoptotische Zellen aufgeteilt. Unbehandelte Kontroll-Zellen wurden ebenfalls zum gleichen Zeitpunkt untersucht.

Bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 ergab sich bei keiner der Mono- oder Kombinations-Therapien eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Daher sind in Tabelle 7 exemplarisch die Daten der MCL-Zelllinie Rec-1 aufgeführt.

Die aufgeführten Apoptose-Daten der MCL-Zelllinie Rec-1 verdeutlichen dass sich lediglich durch eine Therapie mit Dexamethason (D) und durch die Kombination mit Ibrutinib (Ibru/D) eine deutlich erhöhte Apoptoserate ergab. Alle anderen Medikamente führten lediglich zu einer sehr geringen Veränderung bei der gewählten Dosis. Bei den unbehandelten Kontroll-Zellen waren 5,8% der Zellen apoptotisch (früh- und spät-apoptotisch), nach der Therapie mit Dexamethason 12,3% und nach Ibru/D fanden sich 22,8% apoptotische Zellen. Die Kombinations-Therapie Ibru/D führte also, im Vergleich mit den unbehandelten Kontroll-Zellen, zu 17,0% mehr apoptotischen Zellen.

Zusammenfassend ist mit der verwendeten geringen Dosis von Cytarabin, Bendamustin und Cisplatin keine deutlich erhöhte beobachtet worden.

	<b>lebend</b>	<b>früh</b>	<b>spät</b>
unbehandelt	89,3%	0,6%	5,2%
Ibru	90,2%	0,9%	6,2%
A	87,6%	1,4%	7,4%
Ibru/A	87,4%	1,1%	8,2%
B	88,1%	1,2%	7,4%
Ibru/B	85,8%	1,0%	9,2%
C	90,9%	0,9%	5,6%
Ibru/C	90,6%	1,0%	6,2%
D	84,9%	1,7%	10,6%
Ibru/D	74,5%	1,5%	21,3%

**Tabelle 7: Apoptose-FACS Daten nach 48 Stunden bei Rec-1**

Es handelt sich um die gemessenen Absolut-Werte in %, angegeben sind jeweils die Anteile der lebenden, der früh- und spät-apoptotischen Zellen der MCL-Zelllinie Rec-1. Gezeigt werden die Werte der unbehandelten Kontroll-Zellen und der behandelten Zellen mit folgenden Medikamenten und deren Kombinationen: Ibrutinib (Ibru), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C) und Dexamethason (D). Es wurden jeweils in 2 voneinander unabhängigen Experimenten mindestens 10000 Zellen im Durchflusszytometer 48 Stunden nach Behandlung analysiert.

#### 5.1.4.2 Änderungen im Zellzyklusprofil

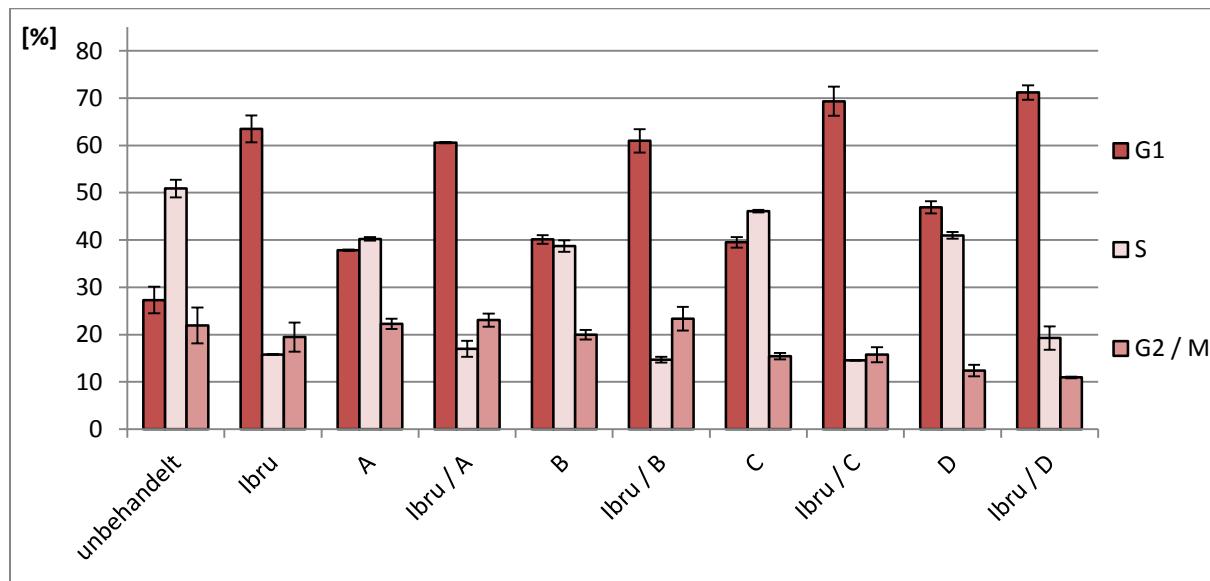
Durch die verwendeten Therapeutika und deren Kombination ergaben sich Änderungen im Zellzyklusprofil welche im Durchflusszytometer analysiert wurden. In dieser Arbeit wurden die FACS-Analysen bei den Zelllinien Rec-1 und BALL-1 durchgeführt, hier werden zur Verdeutlichung die Daten graphisch anhand der MCL-Zelllinie Rec-1 in Abb. 10a dargestellt.

Bei den unbehandelten Zellen befanden sich  $27,3\% \pm 2,8$  in der G1-Phase,  $50,9\% \pm 1,9$  in der S-Phase und  $21,9\% \pm 3,8$  in der G2/M-Phase des Zellzyklus.

Durch die Behandlung mit den verschiedenen Medikamenten und deren Kombinationen ergab sich in allen Fällen ein G1-Arrest. Dieser Effekt war die Monotherapie betreffend bei Ibrutinib am stärksten ausgeprägt.

Nach Therapie mit Ibrutinib war der Anteil der Zellen in der G1-Phase um  $36,2\% \pm 2,9$  erhöht, nach Cytarabin um  $10,5\% \pm 0,1$ , nach Bendamustin um  $12,8\% \pm 0,9$ , nach

Cisplatin um  $12,2\% \pm 1,1$  und nach Dexamethason um  $19,6\% \pm 1,3$ . In der Kombinations-Therapie zeigten sich ähnlich starke G1-Arreste wie nach Monotherapie mit Ibrutinib. Nach Therapie mit Ibru/A befanden sich in der G1-Phase  $33,3\% \pm 0,2$  mehr Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, nach Ibru/B waren es  $33,7\% \pm 2,5$  mehr, nach Ibru/C  $42,0\% \pm 3,1$  und nach Ibru/D  $43,9\% \pm 1,5$  mehr Zellen in der G1-Phase.



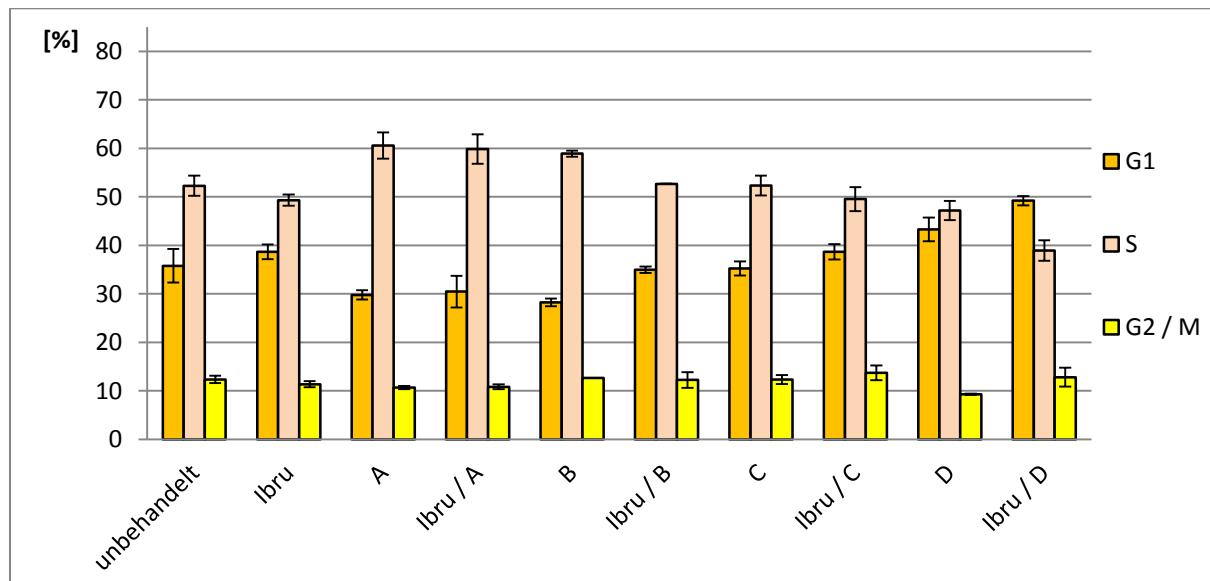
**Abbildung 10a: Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei Rec-1**

Auf der Y-Achse finden sich die Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen in %. Auf der X-Achse sind die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Ibru/A, Ibru/B, Ibru/C und Ibru/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinie Rec-1 für jeweils 48 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 ergaben sich die in Abb. 10b dargestellten Ergebnisse. Die Zellzyklus-Änderungen waren hier insgesamt deutlich geringer ausgeprägt als bei der MCL-Zelllinie Rec-1 (Vgl. Abb. 10a).

Es befanden sich  $35,8\% \pm 3,5$  der unbehandelten Kontroll-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus,  $52,3\% \pm 2,1$  in der S-Phase und  $12,4\% \pm 0,7$  in der G2/M-Phase. Die Therapie mit Ibrutinib führte zu einem um nur  $2,9\% \pm 1,5$  erhöhten Anteil der Zellen in der G1-Phase, das Zellzyklusprofil blieb also trotz Therapie beinahe unverändert. Durch Cytarabin erhöhte sich der Anteil der Zellen in der S-Phase um  $8,3\% \pm 2,7$ , durch Bendamustin um  $6,6\% \pm 0,7$ . Die Monotherapie mit Cisplatin veränderte das Zellzyklusprofil, verglichen mit den unbehandelten Kontroll-Zellen, nicht.

Nur Dexamethason führte zu einem leichten Arrest in der G1-Phase um  $7,5\% \pm 2,4$ . In der Kombinations-Therapie zeigten sich nach Ibru/A  $7,6\% \pm 3,1$  mehr Zellen in der S-Phase verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Nach Ibru/B blieb das Zellzyklusprofil unverändert. Ibru/C führte zu einem um nur  $2,9\% \pm 1,6$  erhöhten Anteil der Zellen in der G1-Phase, das Zellzyklusprofil veränderte sich also kaum. Ibru/D ergab einen G1-Arrest von  $13,4\% \pm 0,9$ .



**Abbildung 10b: Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei BALL-1**

Auf der Y-Achse finden sich die Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen in %. Auf der X-Achse sind die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Ibru/A, Ibru/B, Ibru/C und Ibru/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der ALL-Zelllinie BALL-1 für jeweils 48 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

## 5.2 Idelalisib

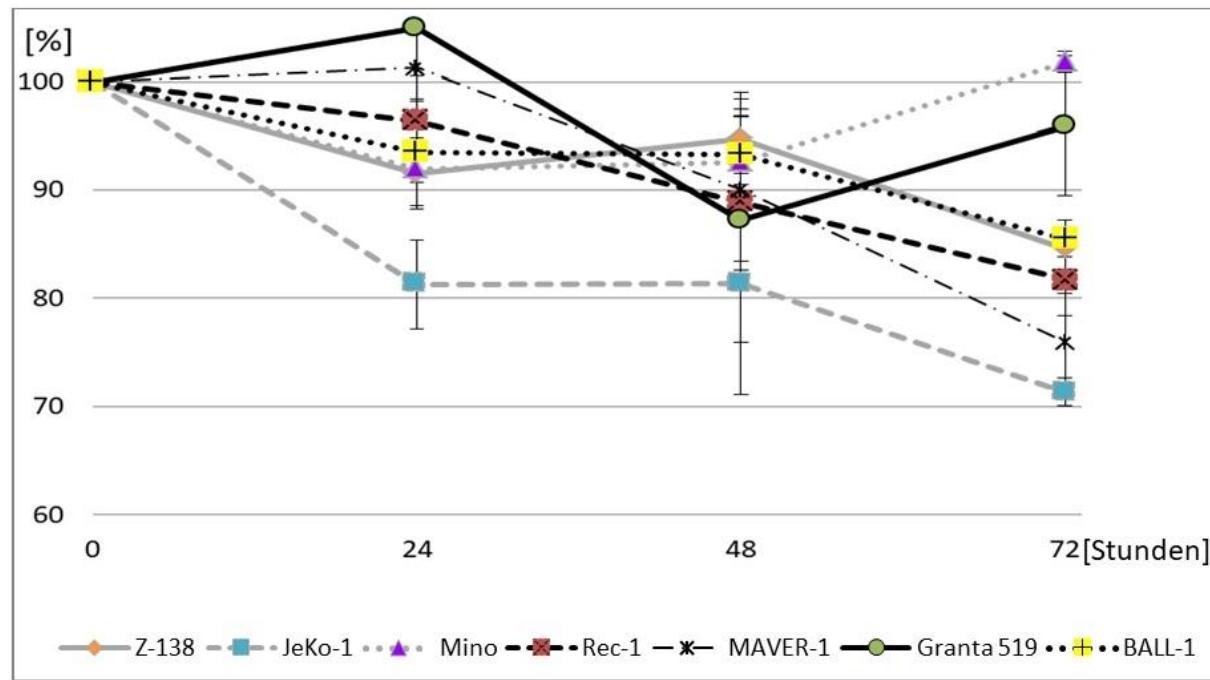
### 5.2.1 Dosisfindung

Die zu verwendende Dosis von  $5 \mu\text{M}$  für die in vitro Therapie der MCL-Zellen war innerhalb der Arbeitsgruppe bereits, wie unter 4.3.3 beschrieben, etabliert worden.

### 5.2.2 Wachstumskurven bei $5 \mu\text{M}$

Alle Zelllinien (MCL und ALL) wurden für insgesamt 72 Stunden mit  $5 \mu\text{M}$  Idelalisib therapiert um die Proliferationshemmung des Medikaments beurteilen zu können.

Das Zellwachstum wurde bei unbehandelten Kontroll-Zellen der jeweiligen Zelllinie und bei den behandelten Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-CELL gemessen und die Ergebnisse verglichen.



**Abbildung 11: Wachstumskurven bei Therapie mit 5  $\mu$ M Idelalisib**

Auf der Y-Achse ist das relative Zellwachstum im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse ist die Dauer der Behandlung mit 5  $\mu$ M Idelalisib in Stunden aufgetragen. Gezeigt sind die Wachstumskurven der Zelllinien Z-138, JeKo-1, Mino, Rec-1, MAVER-1, Granta 519 und BALL-1.

Nach 24 Stunden war das Zellwachstum bei Mino um  $7,9\% \pm 1,3$  und nach 48 Stunden um  $7,4\% \pm 4,3$  vermindert. Bei Granta zeigte sich kein Therapie-Erfolg nach 24 Stunden, nach 48 Stunden war die Proliferation um  $12,8\% \pm 11,2$  vermindert. Nach 72 Stunden Therapie zeigten die Zelllinien Mino und Granta 519 jedoch keine eingeschränkte Proliferation und wurden daher als resistent eingestuft. Die anderen 5 Zelllinien zeigten eine zeitabhängige Wachstumshemmung und gelten daher als sensible Zelllinien. Bei Z-138 fand sich an Tag 1 eine um  $8,5\% \pm 3,3$ , an Tag 2 um  $5,3\% \pm 4,3$  und an Tag 3 eine um  $15,5\% \pm 1,9$  eingeschränkte Proliferation.

Bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 war das Zellwachstum zum ersten und zweiten Messzeitpunkt um ca. 6% verringert, nach 72 Stunden dann um  $14,5\% \pm 1,7$ . Bei Rec-1 war die Proliferation nach 24 Stunden um  $3,6\% \pm 1,8$  geringer als bei der unbehandelten Kontrolle, nach 48 Stunden um  $11,2\% \pm 5,4$  und nach 72 Stunden um  $18,3\% \pm 3,4$ . Am sensibelsten reagierten die Zelllinien MAVER-1 und JeKo-1 auf die Therapie mit 5  $\mu$ M Idelalisib. Bei MAVER-1 war das Zellwachstum nach 24 Stunden

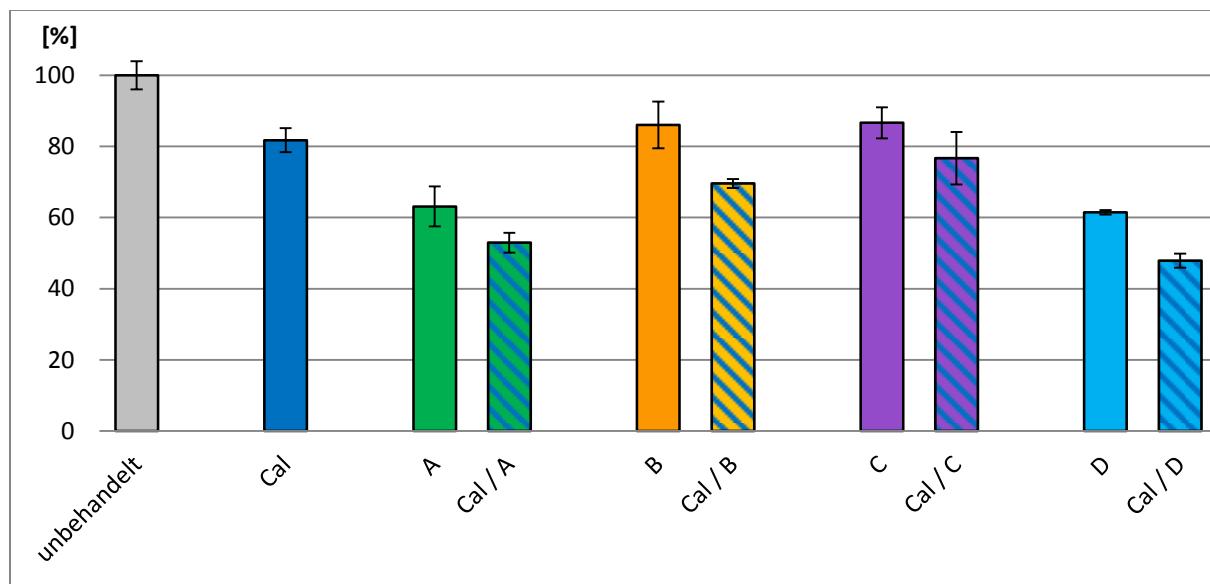
noch nicht, nach 48 Stunden um  $9,9\% \pm 7,4$  und nach 72 Stunden um  $23,9\% \pm 4,4$  eingeschränkt. JeKo-1 zeigte nach 24 Stunden schon eine Proliferations-Einschränkung von  $18,8\% \pm 4,1$ , nach 48 Stunden von  $18,7\% \pm 10,2$  und nach 72-stündiger Behandlung von  $28,7\% \pm 1,3$ .

### 5.2.3 Kombinationsassays

#### 5.2.3.1 Kombinations-Therapie

Nun wurden die MCL- und ALL-Zellen mit Kombinationen aus Idelalisib und Cytarabin, Bendamustin, Cisplatin oder Dexamethason behandelt. Dann konnte anhand der Zellzählungs-Daten die Fraction of Product berechnet werden um die Effekte der Kombinations-Therapien zu evaluieren. Die Versuche wurden mit allen 6 MCL-Zelllinien und der ALL-Zelllinie BALL-1 durchgeführt.

Abb. 12a zeigt die Ergebnisse bei der sensiblen MCL-Zelllinie Rec-1.



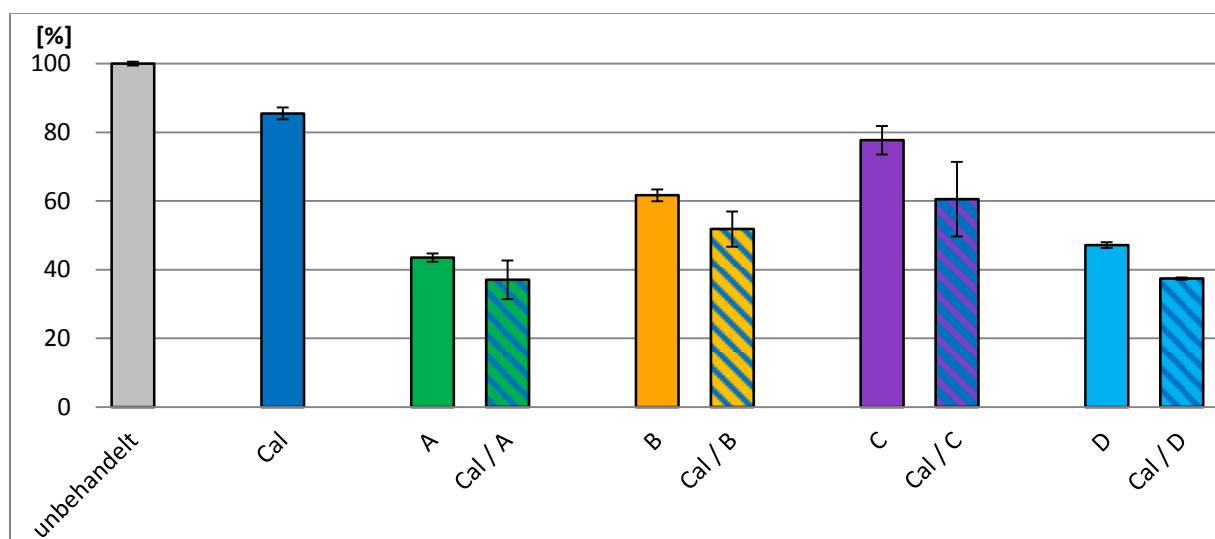
**Abbildung 12a: Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei Rec-1**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Idelalisib (Cal), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Cal/A, Cal/B, Cal/C und Cal/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinie Rec-1 für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Die Monotherapie mit  $5 \mu\text{M}$  Idelalisib führte zu einer Zellzahl-Reduktion von  $18,3\% \pm 3,4$  im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen. Rec-1 reagierte in der Monotherapie ebenfalls sensibel auf eine Behandlung mit Cytarabin, Bendamustin, Cisplatin und Dexamethason (siehe 5.1.3.1). Die Kombination mit

Idelalisib schränkte die Proliferation noch zusätzlich ein. Mit einer Kombination aus Cytarabin und Idelalisib (Cal/A) ergab sich eine Wachstumshemmung von  $47,1\% \pm 2,8$ , mit Bendamustin und Idelalisib (Cal/B) von  $30,4\% \pm 1,3$ , mit Cisplatin und Idelalisib (Cal/C) von  $23,3\% \pm 7,4$  und durch die Kombinations-Therapie aus Dexamethason und Idelalisib (Cal/D) wurde die Proliferation um  $52,1\% \pm 1,9$  eingeschränkt.

Abb. 12b stellt nun die Ergebnisse der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 für die Kombinations-Therapie mit Idelalisib dar.



**Abbildung 12b: Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei BALL-1**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Idelalisib (Cal), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Cal/A, Cal/B, Cal/C und Cal/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der ALL-Zelllinie BALL-1 für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Die Monotherapie mit Idelalisib führte zu einer Verminderung der Zellzahl von  $14,5\% \pm 1,7$ . BALL-1 zeigte sich, wie bereits unter 5.1.3.1 beschrieben, ebenfalls sensibel auf die Therapie mit Cytarabin, Bendamustin, Cisplatin und Dexamethason. Durch die kombinierte Gabe von  $5\mu\text{M}$  Idelalisib konnte die Proliferation noch zusätzlich eingeschränkt werden. Durch die Kombination von Cytarabin und Idelalisib (Cal/A) ergab sich eine Wachstumshemmung von  $62,9\% \pm 5,7$ , mit Bendamustin (Cal/B) von  $48,2\% \pm 5,1$ , mit Cisplatin (Cal/C)  $39,5\% \pm 10,9$  und durch die Kombination von Dexamethason und Idelalisib (Cal/D) wurde die Proliferation um  $62,6\% \pm 0,3$  verringert.

Die Errechnung der Fraction of Product ergab sowohl bei Rec-1 als auch bei BALL-1 für alle Kombinationen additive Effekte. In Tabelle 8 werden die Fraction of Product-Ergebnisse aller Zelllinien für die Kombinations-Therapie mit Idelalisib dargestellt.

	<b>Cal/A</b>	<b>Cal/B</b>	<b>Cal/C</b>	<b>Cal/D</b>
Z-138	- 0,01	<b>- 0,11</b>	- 0,07	0,06
JeKo-1	- 0,06	<b>- 0,13</b>	<b>- 0,13</b>	- 0,07
Mino	- 0,03	0,02	- 0,05	- 0,02
Rec-1	- 0,01	0,01	- 0,06	0,02
MAVER-1	- 0,08	- 0,04	- 0,02	- 0,04
Granta 519	0,06	- 0,03	- 0,04	<b><u>0,12</u></b>
BALL-1	0,00	0,01	0,06	0,03

**Tabelle 8: Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Idelalisib**

Normal gedruckte Werte einen Additivismus und fett gedruckte Werte einen Antagonismus. Fett gedruckte und unterstrichene Werte zeigen einen Synergismus der betreffenden Kombination.

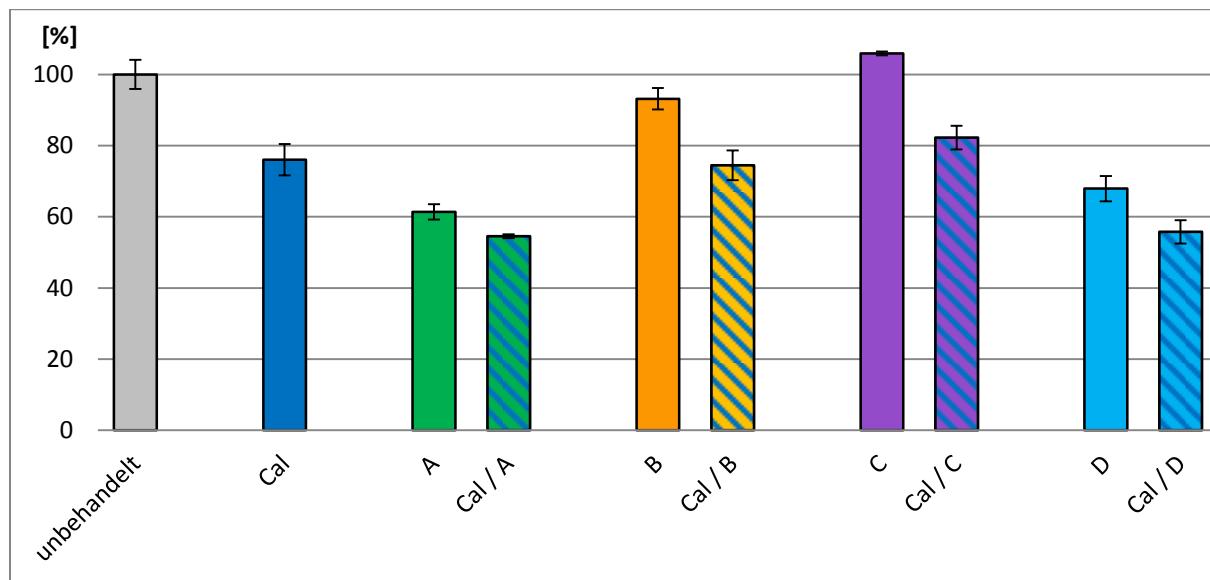
Die Medikamenten-Kombination Cal/A zeigte bei allen Zelllinien additive Effekte. Für Cal/B ergaben sich außer bei Z-138 und JeKo-1 Additivismen bei 5 von 7 Zelllinien. Die Kombination von Idelalisib und Cisplatin zeigte außer bei JeKo-1 additive Effekte in 6 von 7 Zelllinien. Cal/D wirkte durchweg additiv, bei Granta 519 sogar synergistisch.

### 5.2.3.2 Kombinations-Therapie ohne und mit Feeder Layer

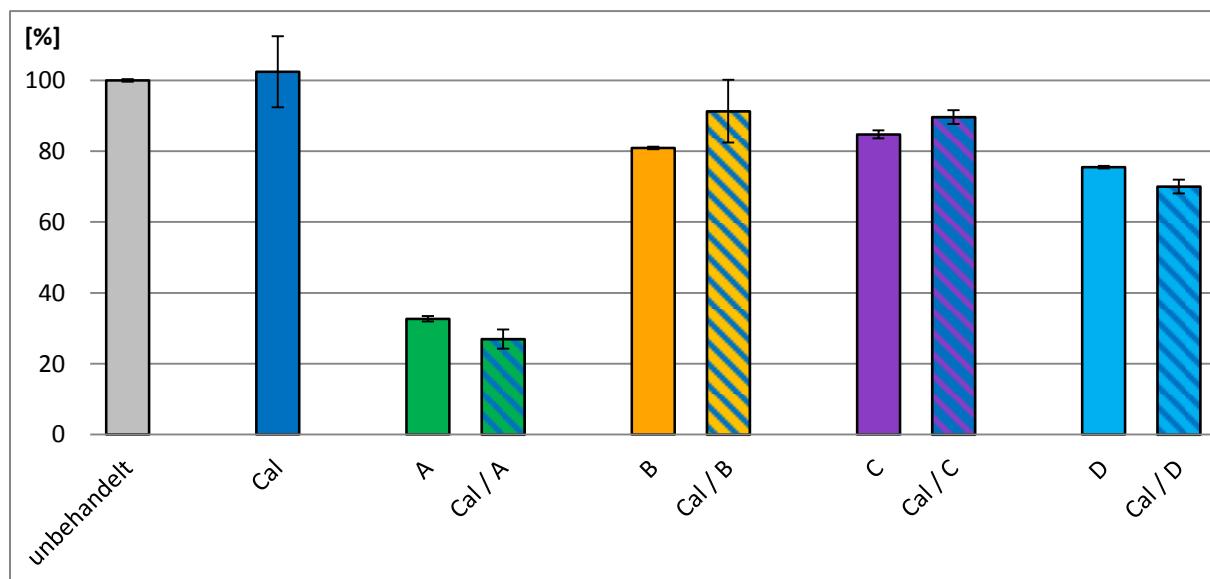
Des Weiteren wurden die Zellen der beiden sensiblen Zelllinien MAVER-1 und BALL-1 auf Feeder Layer kultiviert. Die Zellen wurden nach 72 Stunden sowohl unbehandelt als auch nach Mono- oder Kombinations-Therapie mittels Vi-CELL analysiert.

In Abb. 13 wird die Kombinations-Therapie mit Idelalisib ohne und mit Feeder Layer anhand der MCL-Zelllinie MAVER-1 dargestellt.

(a)



(b)



**Abbildung 13a/b: Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei MAVER-1 ohne und mit Feeder Layer**

Abb. 13a zeigt die Kombinations-Therapie ohne, Abb. 13b die Kombinations-Therapie mit Feeder Layer. Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Idelalisib (Cal), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Cal/A, Cal/B, Cal/C und Cal/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinie MAVER-1 (auf Feeder Layer Zellen) kultiviert und für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

In der Kombinations-Therapie ohne Feeder Layer (Abb. 13a) zeigte sich nach Idelalisib-Monotherapie eine um  $24,0\% \pm 4,4$  verringerte Wachstumsrate. Die Cytarabin-Monotherapie führte zu einem um  $38,6\% \pm 2,2$ , Cal/A zu einem um

45,5%  $\pm$ 0,5 eingeschränkten Wachstum. Nach der Behandlung mit Bendamustin ergab sich eine Proliferationseinschränkung von 6,9%  $\pm$ 3,0 und nach Cal/B von 25,6%  $\pm$ 4,2. Cisplatin ergab keine Proliferationseinschränkung, Cal/C führte jedoch zu einem um 17,8%  $\pm$ 3,4 eingeschränktem Wachstum. Die Dexamethason-Monotherapie erzielte eine relative Zellzahlreduktion von 32,1%  $\pm$ 3,5 und in Kombination mit Idelalisib (Cal/D) von 44,2%  $\pm$ 3,3.

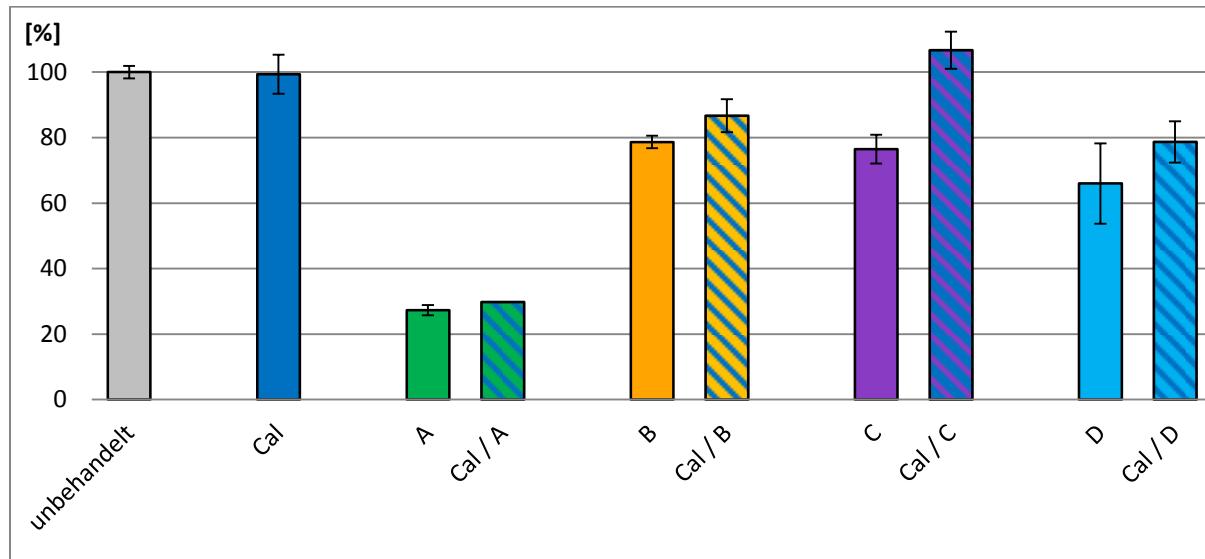
Bei der Kombinations-Therapie auf Feeder Layer (Abb. 13b) ergab sich hingegen in der Monotherapie mit Idelalisib keine verringerte Wachstumsrate im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen. Die Monotherapie mit Cytarabin zeigte eine um 67,3%  $\pm$ 0,8 und die Kombination von Cytarabin und Idelalisib (Cal/A) zeigte eine um 73,0%  $\pm$ 2,7 verringerte Proliferation. Bendamustin erzielte eine relative Zellzahlreduktion von 19,1%  $\pm$ 0,4 und in Kombination mit Idelalisib von 8,7%  $\pm$ 8,8. Durch die Therapie mit Cisplatin konnte das Zellwachstum um 15,3%  $\pm$ 1,2 verringert werden, zusammen mit Idelalisib um 10,4%  $\pm$ 1,9. Die Monotherapie mit Dexamethason führte zu einer Wachstumshemmung von 24,5%  $\pm$ 0,4, die Kombinations-Therapie mit Idelalisib zu einer Wachstumshemmung von 29,9%  $\pm$ 1,9.

Insgesamt konnte der ohne Feeder Layer beobachtete Effekt von Idelalisib in den Versuchen mit Feeder Layer nicht gezeigt werden. Die verwendeten Chemotherapeutika zeigten sich in ihrer Wirksamkeit ohne und mit Feeder Layer ähnlich effektiv.

Die Ergebnisse der Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 auf Feeder Layer werden in Abb. 13c dargestellt. Zum Vergleich wurden die Daten der Kombinations-Versuche von BALL-1 ohne Feeder Layer bereits in Abb. 12b dargestellt und unter 5.2.3.1 beschrieben.

Die Zellen der ALL-Zelllinie BALL-1 zeigten nach einer Kultivierung auf Feeder Layer und Monotherapie mit Idelalisib kein verringertes Wachstum im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach Monotherapie mit Cytarabin fand sich eine um 72,7%  $\pm$ 1,6 und nach Kombination von Cytarabin und Idelalisib (Cal/A) fand sich eine um 70,2%  $\pm$ 0,0 verringerte Proliferation. Durch die Monotherapie mit Bendamustin konnte das Zellwachstum um 21,3%  $\pm$ 1,9 verringert werden, zusammen mit Idelalisib um 13,3%  $\pm$ 5,1. Cisplatin erzielte eine relative Zellzahlreduktion von 23,6%  $\pm$ 4,4, in Kombination mit Idelalisib fand allerdings keine Zellzahlreduktion statt. Die

Behandlung mit Dexamethason führte zu einer Wachstumshemmung von 34,0%  $\pm$ 12,3, die Kombinations-Therapie Cal/D hingegen nur zu einer Wachstumshemmung von 21,3%  $\pm$ 6,3.



**Abbildung 13c: Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei BALL-1 auf Feeder Layer**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Idelalisib (Cal), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Cal/A, Cal/B, Cal/C und Cal/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der ALL-Zelllinie BALL-1 auf Feeder Layer Zellen kultiviert und für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Der durch Idelalisib verursachte zytoreduktive Effekt ohne Feeder Layer bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 zeigte sich in den Versuchen mit Feeder Layer nicht.

Die Fraction of Product-Ergebnisse der Kombinations-Versuche ohne und mit Feeder Layer sind nun in Tabelle 9 dargestellt.

	<b>Cal/A</b>	<b>Cal/B</b>	<b>Cal/C</b>	<b>Cal/D</b>
MAVER-1	- 0,08	- 0,04	- 0,02	- 0,04
BALL-1	0,00	0,01	0,06	0,03
MAVER-1	0,07	- 0,08	- 0,03	0,07
BALL-1	- 0,03	- 0,09	<b>- 0,31</b>	<b>- 0,13</b>

**Tabelle 9: Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Idelalisib ohne und mit Feeder Layer**

Normal gedruckte Werte stehen für additive Effekte der verwendeten Medikamentenkombinationen, fett gedruckte Werte zeigen antagonistische Effekte. Weiß hinterlegt sind die Ergebnisse der Versuche ohne Feeder Layer, die Ergebnisse mit Feeder Layer sind hellblau hinterlegt.

Für die Vergleichs-Zelllinie BALL-1 ergaben sich durch die Errechnung der Fraction of Product Additivismen für die Kombinationen Cal/A und Cal/B, aber Antagonismen für die Kombinationen Cal/C und Cal/D. Bei MAVER-1 zeigten hingegen alle 4 Medikamenten-Kombinationen additive Effekte.

Im Vergleich dazu ergaben sich bei MAVER-1 und BALL-1 ohne Feeder Layer in allen Kombinationen additive Effekte.

## 5.2.4 FACS-Analysen

### 5.2.4.1 Apoptose

Die Anteile von lebenden, früh- und spät-apoptotischen Zellen nach medikamentöser Therapie wurden bei den Zelllinien Rec-1 und BALL-1 durchflusszytometrisch gemessen und mit den Werten unbehandelter Kontroll-Zellen verglichen.

Bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 führte keine der Mono- oder Kombinations-Therapien, verglichen mit unbehandelten Zellen, zu einer erhöhten Apoptoserate.

In Tabelle 10 sind daher die Apoptose-Daten der MCL-Zelllinie Rec-1 dargestellt.

Es zeigte sich nach 48-stündiger Behandlung kaum eine Veränderung. Bei den unbehandelten Zellen waren 5,8% apoptotisch (früh- und spät-apoptotisch). Die Behandlung mit Idelalisib, Cytarabin, Bendamustin, Cisplatin und mit deren Kombinationen Cal/A, Cal/B und Cal/C führte zu keiner veränderten der

Apoptoserate. Nach der Therapie mit Dexamethason waren 12,3% und nach der Kombinations-Therapie (Cal/D) waren 18,9% der Zellen apoptotisch. Nur Dexamethason führte somit zu einer Steigerung der apoptotischen Zellen um 6,5% und Cal/D führte zu 13,1% mehr apoptotischen Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

	<b>lebend</b>	<b>früh</b>	<b>spät</b>
unbehandelt	89,3%	0,6%	5,2%
Cal	89,7%	0,6%	5,9%
A	87,6%	1,4%	7,4%
Cal/A	85,5%	1,3%	9,4%
B	88,1%	1,2%	7,4%
Cal/B	86,3%	1,1%	8,6%
C	90,9%	0,9%	5,6%
Cal/C	89,7%	0,9%	6,3%
D	84,9%	1,7%	10,6%
Cal/D	77,3%	1,9%	16,9%

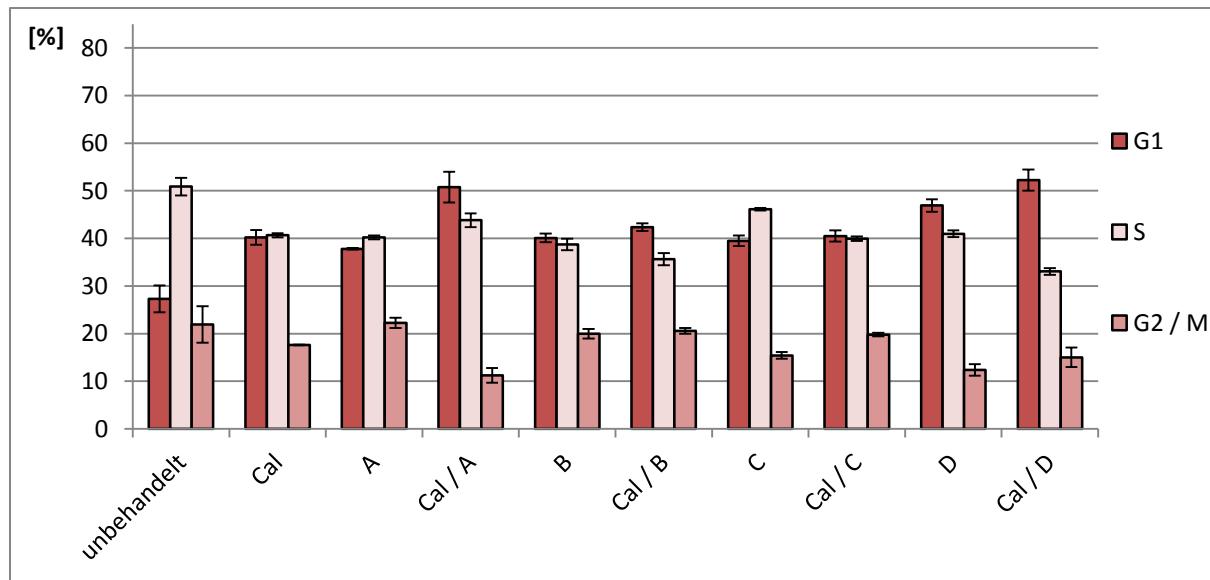
**Tabelle 10: Apoptose-FACS Daten nach 48 Stunden bei Rec-1**

Es handelt sich um die gemessenen Absolut-Werte in %, angegeben sind jeweils die Anteile der lebenden, der früh- und spät-apoptotischen Zellen der Zelllinie Rec-1. Gezeigt werden die Werte der unbehandelten Kontroll-Zellen und der behandelten Zellen mit folgenden Medikamenten und deren Kombinationen: Idelalisib (Cal), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C) und Dexamethason (D). Es wurden jeweils in 2 voneinander unabhängigen Experimenten mindestens 10000 Zellen im Durchflusszytometer 48 Stunden nach Behandlung analysiert.

#### 5.2.4.2 Änderungen im Zellzyklusprofil

Es wurden Zellzyklus-FACS-Analysen bei den Zelllinien Rec-1 und BALL-1 durchgeführt und die Daten der unbehandelten Kontroll-Zellen mit den Daten der behandelten Zellen verglichen.

Die Änderungen im Zellzyklusprofil der Zelllinie Rec-1 werden in Abb. 14a graphisch dargestellt.



**Abbildung 14a: Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei Rec-1**

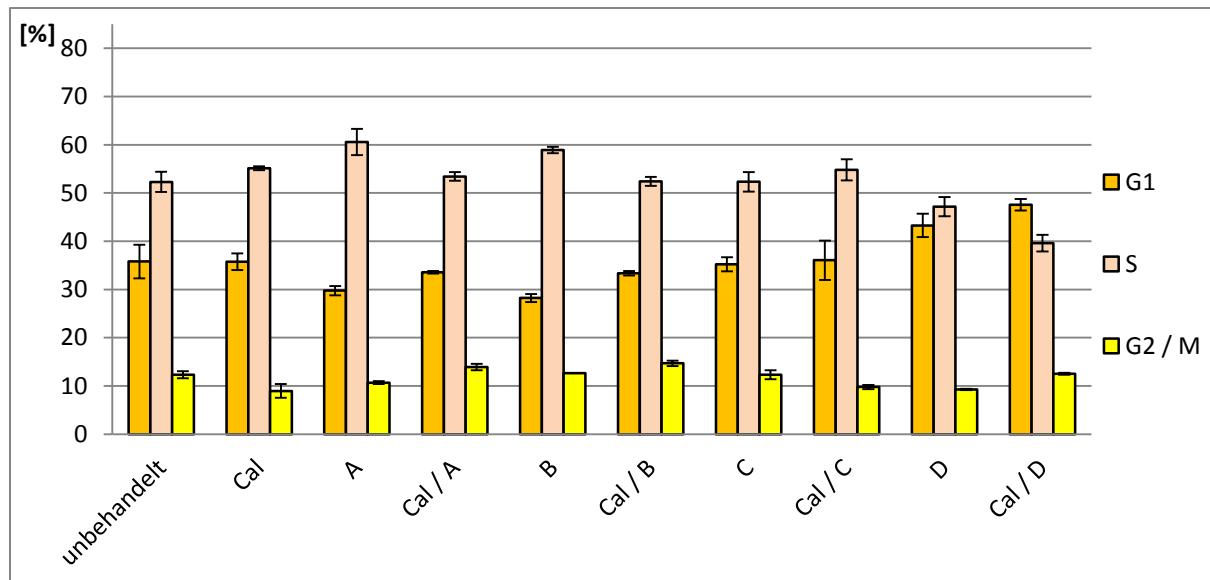
Auf der Y-Achse finden sich die Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen in %. Auf der X-Achse sind die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Idelalisib (Cal), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Cal/A, Cal/B, Cal/C und Cal/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der Zelllinie Rec-1 für jeweils 48 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Es befanden sich von den unbehandelten Kontroll-Zellen  $27,3\% \pm 2,8$  in der G1-Phase des Zellzyklus,  $50,9\% \pm 1,9$  in der S-Phase und  $21,9\% \pm 3,8$  in der G2/M-Phase. Alle eingesetzten Mono- und Kombinations-Therapien führten zu einem G1-Arrest im Vergleich zur Kontrolle. Die Therapie mit Idelalisib führte zu einem um  $12,9\% \pm 1,5$  erhöhten Anteil der Zellen in der G1-Phase, durch Cytarabin erhöhte sich der Anteil um  $10,5\% \pm 0,1$ , durch Bendamustin um  $12,8\% \pm 0,9$ , durch Cisplatin um  $12,2\% \pm 1,14$  und durch Dexamethason um  $19,6\% \pm 1,3$ .

In der Kombinations-Therapie zeigten sich nach Cal/A  $23,5\% \pm 3,2$  mehr Zellen in der G1-Phase verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, nach Cal/B waren es  $15,1\% \pm 0,8$  mehr, nach Cal/C  $13,2\% \pm 1,2$  und nach Cal/D  $24,9\% \pm 2,6$ .

Insgesamt war der erzielte G1-Arrest bei den Kombinations-Therapien von Idelalisib mit Cytarabin und Dexamethason am stärksten ausgeprägt.

In Abb. 14b sind die Zellzyklus-Daten der ALL-Zelllinie BALL-1 nach Kombinations-Therapie mit Idelalisib graphisch dargestellt.



**Abbildung 14b: Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei BALL-1**

Auf der Y-Achse finden sich die Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen in %. Auf der X-Achse sind die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Idelalisib (Cal), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Cal/A, Cal/B, Cal/C und Cal/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der ALL-Zelllinie BALL-1 für jeweils 48 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 waren die Veränderungen des Zellzyklusprofils, verglichen mit Rec-1 (Vgl. Abb.14a), deutlich geringer ausgeprägt. Die unbehandelten Kontroll-Zellen zeigten folgende prozentuale Verteilung auf die Zellzyklusphasen:  $35,8\% \pm 3,5$  in der G1-Phase,  $52,3\% \pm 2,1$  in der S-Phase und  $12,4\% \pm 0,7$  in der G2/M-Phase. Nach Monotherapie mit Idelalisib war der Anteil der Zellen in der S-Phase um  $2,8\% \pm 0,4$  erhöht, es zeigte sich also nur eine minimale Änderung des Zellzyklusprofils. Nach Cytarabin befanden sich  $8,3\% \pm 2,7$  und nach Bendamustin  $6,6\% \pm 0,7$  mehr Zellen in der S-Phase. Cisplatin führte zu keiner Änderung im Zellzyklusprofil. Nach Monotherapie mit Dexamethason zeigte sich ein G1-Arrest mit einem um  $7,5\% \pm 2,4$  erhöhten Anteil von Zellen in der G1-Phase. Die Kombinations-Therapie mit Cal/A, Cal/B und Cal/C führte zu keinem veränderten Zellzyklusprofil verglichen mit den unbehandelten Kontroll-Zellen. Nach Kombinations-Therapie mit Cal/D befanden sich  $11,8\% \pm 1,2$  mehr Zellen in der G1-Phase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

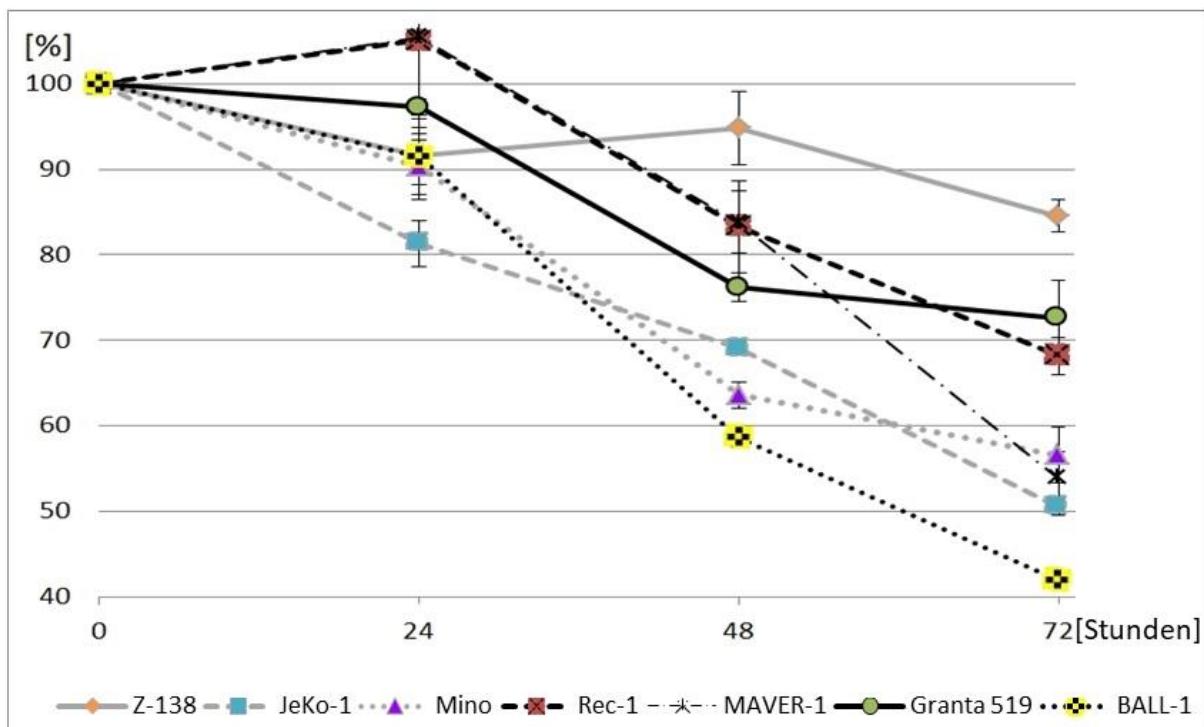
## 5.3 Temsirolimus

### 5.3.1 Dosisfindung

Die in dieser Arbeit verwendete Dosis von 10 nM wurde bereits im Vorfeld in der Arbeitsgruppe wie unter 4.3.3 beschrieben etabliert.

### 5.3.2 Wachstumskurven bei 10 nM

Die MCL- und ALL-Zellen wurden für insgesamt 72 Stunden mit Temsirolimus behandelt um die Wachstumshemmung des Medikaments beurteilen zu können. Die Proliferation wurde bei unbehandelten Kontroll-Zellen der jeweiligen Zelllinie und bei den behandelten Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden mit dem Vi-CELL Zellzählgerät gemessen und die Ergebnisse verglichen.



**Abbildung 15: Wachstumskurven bei Therapie mit 10 nM Temsirolimus**

Auf der Y-Achse ist das relative Zellwachstum im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse ist die Dauer der Behandlung mit 10 nM Temsirolimus in Stunden aufgetragen. Gezeigt sind die Wachstumskurven der Zelllinien Z-138, JeKo-1, Mino, Rec-1, MAVER-1, Granta 519 und BALL-1.

Bei allen Zelllinien zeigte sich eine zeitabhängige Proliferationshemmung durch Temsirolimus. Bei Z-138 war die Proliferation im Vergleich zu den anderen Zelllinien mit  $15,5\% \pm 1,9$  nach 72 Stunden am wenigsten eingeschränkt, nach 24 Stunden waren es  $8,5\% \pm 3,3$  und nach 48 Stunden  $5,3\% \pm 4,3$ . Das Zellwachstum bei Rec-1

war nach 24 stündiger Therapie noch nicht, nach 48 Stunden um 16,7%  $\pm$ 5,4 und nach 72 Stunden um 31,9%  $\pm$ 2,2 eingeschränkt. Bei MAVER-1 konnte an Tag 1 ebenfalls noch kein verringertes Zellwachstum festgestellt werden, an Tag 2 war das Wachstum um 16,2%  $\pm$ 3,6 und an Tag 3 um 46,1%  $\pm$ 3,0 verringert. Bei den Zellen von Granta 519 zeigte sich nach 24 Stunden eine minimale Einschränkung der Proliferation von 2,8%  $\pm$ 0,9, nach 48 Stunden von 23,8%  $\pm$ 1,7 und nach 72 Stunden von 27,4%  $\pm$ 4,3. An Tag 1 war das Zellwachstum bei Mino um 9,7%  $\pm$ 3,9, an Tag 2 um 36,4%  $\pm$ 1,6 und an Tag 3 um 43,4%  $\pm$ 3,3 vermindert. JeKo-1 zeigte ein um 18,8%  $\pm$ 2,7 verringertes Wachstum nach 24, um 30,9%  $\pm$ 0,4 nach 48 und um 49,5%  $\pm$ 1,1 nach 72 Stunden. Am sensibelsten auf die Therapie mit Temsirolimus reagierte die Vergleichs-Zelllinie BALL-1 mit einer Proliferationshemmung von 8,5%  $\pm$ 4,4 nach 24, von 41,3%  $\pm$ 1,1 nach 48 und von 58,0%  $\pm$ 0,9 nach 72 Stunden.

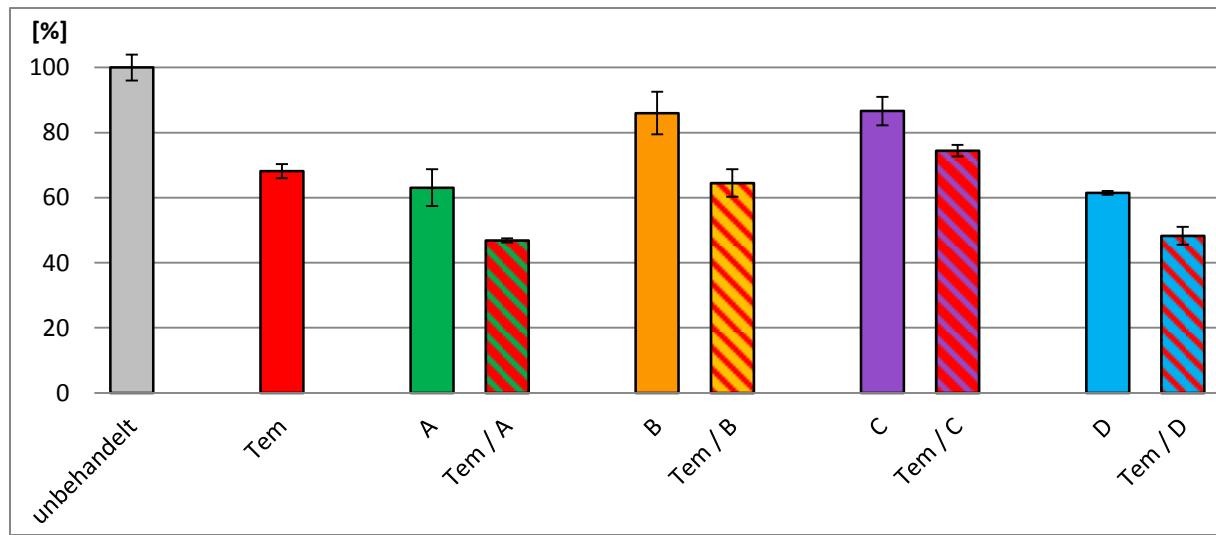
### 5.3.3 Kombinationsassays

#### 5.3.3.1 Kombinations-Therapie ohne Feeder Layer

Alle Zelllinien wurden mit Temsirolimus (Tem), Cytarabin (A), Bandamustin (B), Cisplatin (C) und Dexamethason (D) in Monotherapie und mit den Kombinationen Tem/A, Tem/B, Tem/C und Tem/D behandelt. Nach 72 Stunden wurden die Proliferations-Daten mittels Vi-CELL erhoben und mit Hilfe der Fraction of Product errechnet ob die Kombinations-Therapie additiv oder synergistisch wirkt, oder ob sich antagonistische Effekte zeigen.

In Abb.16a sind die Ergebnisse der sensiblen Zelllinie Rec-1 dargestellt.

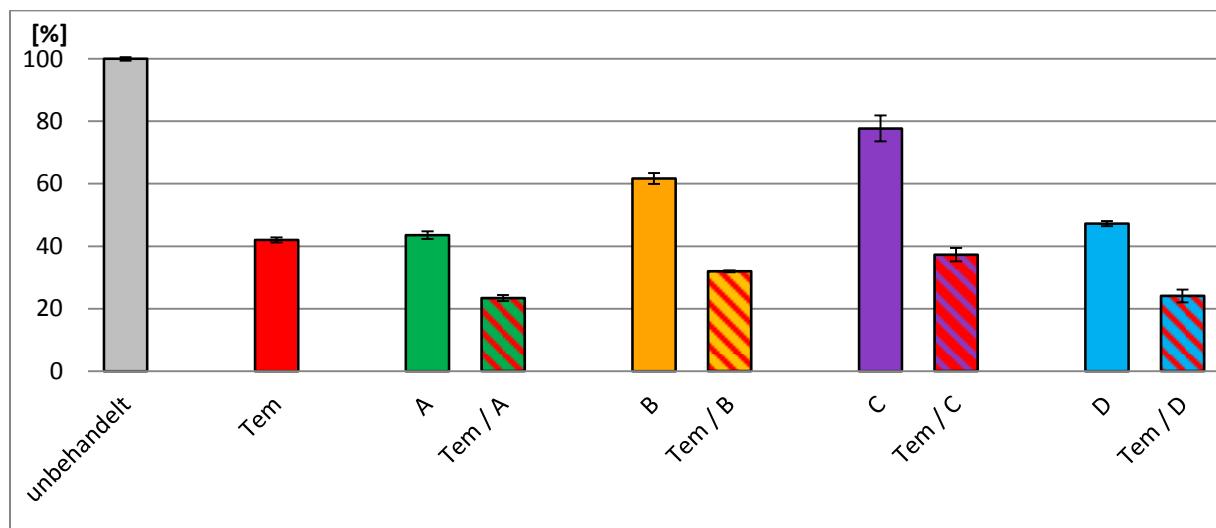
Die Monotherapie mit Temsirolimus führte bei der MCL-Zelllinie Rec-1 zu einer um 31,9%  $\pm$ 2,2 verminderten Proliferation. Rec-1 reagierte, wie bereits unter 5.1.3.1 beschrieben, ebenfalls sensibel auf die Therapie mit Cytarabin, Bendamustin, Cisplatin und Dexamethason. Durch die kombinierte Gabe von 10 nM Temsirolimus konnte die Proliferation noch zusätzlich eingeschränkt werden. Durch die Kombination von Cytarabin und Temsirolimus (Tem/A) ergab sich eine Wachstumshemmung von 53,1%  $\pm$ 0,6, mit Bendamustin (Tem/B) von 35,5%  $\pm$ 4,3, mit Cisplatin (Tem/C) 25,6%  $\pm$ 1,8 und durch die Kombination von Dexamethason und Temsirolimus (Tem/D) wurde die Proliferation um 51,7%  $\pm$ 2,7 verringert.



**Abbildung 16a: Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei Rec-1**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Temsirolimus (Tem), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Tem/A, Tem/B, Tem/C und Tem/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinie Rec-1 für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Die Ergebnisse der Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 werden im Folgenden anhand der Abb. 16b dargestellt.



**Abbildung 16b: Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei BALL-1**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Temsirolimus (Tem), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Tem/A, Tem/B, Tem/C und Tem/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der ALL-Zelllinie BALL-1 für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Die Zellen waren ebenfalls sensibel auf die Monotherapie mit Cytarabin, Bendamustin, Cisplatin und Dexamethason (siehe 5.1.3.1). Die Therapie mit 10 nM Temsirolimus führte zu einer Proliferationseinschränkung von 58,0%  $\pm$ 0,9, in der Kombination mit Cytarabin (Tem/A) war das Zellwachstum um 76,6%  $\pm$ 0,9, mit Bendamustin (Tem/B) um 68,1%  $\pm$ 0,3, mit Cisplatin (Tem/C) um 62,8%  $\pm$ 2,2 und mit Dexamethason (Tem/D) um 75,9%  $\pm$ 2,0 vermindert.

Jede der verwendeten Kombinationen erwies sich für die ALL-Zelllinie BALL-1, nach Errechnung der Fraction of Product, als additiv. Die Kombinations-Therapie Tem/C (Temsirolimus, Cisplatin) ergab bei der MCL-Zelllinie Rec-1 einen Antagonismus. Die 3 übrigen Kombinationen (Tem/A, Tem/B, Tem/D) zeigten additive therapeutische Effekte.

Die Fraction of Product-Ergebnisse aller Zelllinien für die Kombinations-Therapie mit Temsirolimus sind in Tabelle 11 dargestellt.

	<b>Tem/A</b>	<b>Tem/B</b>	<b>Tem/C</b>	<b>Tem/D</b>
Z-138	- 0,03	- 0,05	- 0,04	0,03
JeKo-1	- 0,04	- 0,07	- 0,07	- 0,08
Mino	- 0,08	- 0,04	- 0,03	0,01
Rec-1	- 0,04	- 0,06	<b>- 0,15</b>	- 0,06
MAVER-1	<b>- 0,19</b>	- 0,05	- 0,01	<b>- 0,12</b>
Granta 519	0,04	- 0,01	0,00	0,09
BALL-1	- 0,05	- 0,06	- 0,05	- 0,04

**Tabelle 11: Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Temsirolimus**

Normal gedruckte Werte zeigen einen additiven Effekt, fett gedruckte Ergebnisse zeigen einen Antagonismus.

Es zeigte sich für die Kombination von Temsirolimus und Cytarabin (Tem/A) außer in MAVER-1 in 6 von 7 Zelllinien ein additiver Effekt. Die Therapie mit der Kombination Tem/B war bei allen 7 Zelllinien additiv. Tem/C zeigte außer in Rec-1 additive Effekte bei 6 von 7 Zelllinien. Die Medikamente Temsirolimus und Dexamethason wirkten außer in MAVER-1 in 6 von 7 Zelllinien additiv.

### 5.3.3.2 Kombinations-Therapie ohne und mit Feeder Layer

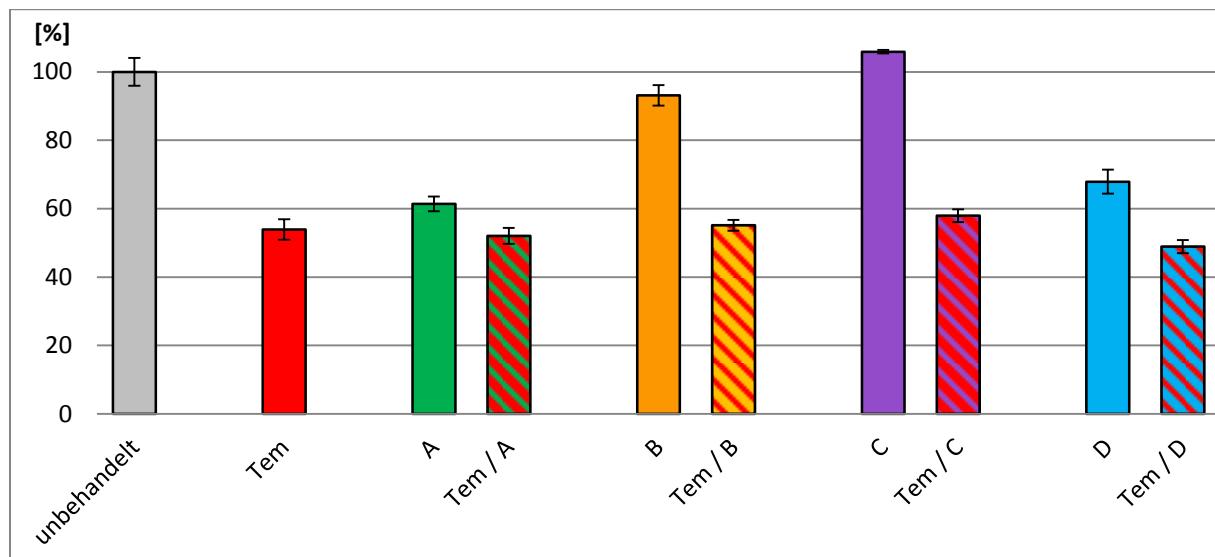
Die beiden sensiblen Zelllinien MAVER-1 (MCL) und BALL-1 (ALL) wurden des Weiteren auf Feeder Layer kultiviert und nach Mono- und Kombinations-Therapie mittels Vi-CELL analysiert. Im Vergleich mit unbehandelten Kontroll-Zellen sollte nach 72-stündiger Therapie beurteilt werden ob eine Aktivierung der MCL- und ALL-Zellen durch die Wachstumsfaktoren des Feeder Layers zu veränderten therapeutischen Effekten von Temsirolimus führt.

In Abb. 17 wird die Kombinations-Therapie mit Temsirolimus anhand der sensiblen MCL-Zelllinie MAVER-1 ohne und mit Feeder Layer dargestellt.

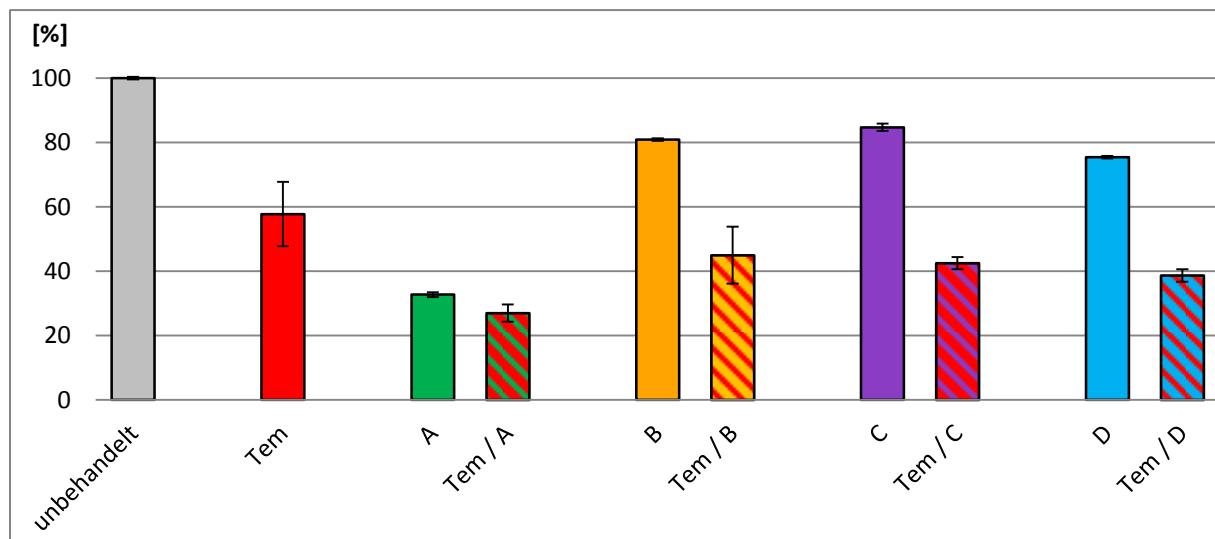
In der Kombinations-Therapie ohne Feeder Layer (Abb. 17a) zeigte sich nach Temsirolimus-Monotherapie eine um  $46,1\% \pm 3,0$  verringerte Wachstumsrate. Die Cytarabin-Monotherapie führte zu einem um  $38,6\% \pm 2,2$ , Tem/A zu einem um  $47,9\% \pm 2,4$  eingeschränkten Wachstum. Nach der Behandlung mit Bendamustin ergab sich eine Proliferationseinschränkung von  $6,9\% \pm 3,0$  und nach Tem/B von  $44,9\% \pm 1,6$ . Cisplatin ergab keine Proliferationseinschränkung, Tem/C führte hingegen zu einem um  $42,1\% \pm 1,9$  eingeschränktem Wachstum. Die Dexamethason-Monotherapie erzielte eine relative Zellzahlreduktion von  $32,1\% \pm 3,5$  und in Kombination mit Temsirolimus (Tem/D) von  $51,1\% \pm 1,9$ .

Nach einer Kultivierung auf Feeder Layer (Abb. 17b) zeigten die Zellen der MCL-Zelllinie MAVER-1 nach Monotherapie mit 10 nM Temsirolimus ein um  $42,2\% \pm 13,1$  verringertes Wachstum im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Wie bereits beschrieben waren die Zellen ebenfalls sensibel auf die Zytostatika-Therapie mit Cytarabin, Bendamustin, Cisplatin und Dexamethason (siehe 5.1.3.2). Nach Kombination von Cytarabin und Temsirolimus (Tem/A) fand sich eine um  $73,0\% \pm 0,4$  verringerte Proliferation. Bendamustin konnte das Zellwachstum zusammen mit Temsirolimus (Tem/B) um  $55,1\% \pm 2,7$  vermindern. Tem/C erzielte eine relative Zellzahlreduktion von  $57,5\% \pm 0,8$  und die Behandlung mit Tem/D führte zu einer Wachstumshemmung von  $61,3\% \pm 2,3$ .

(a)



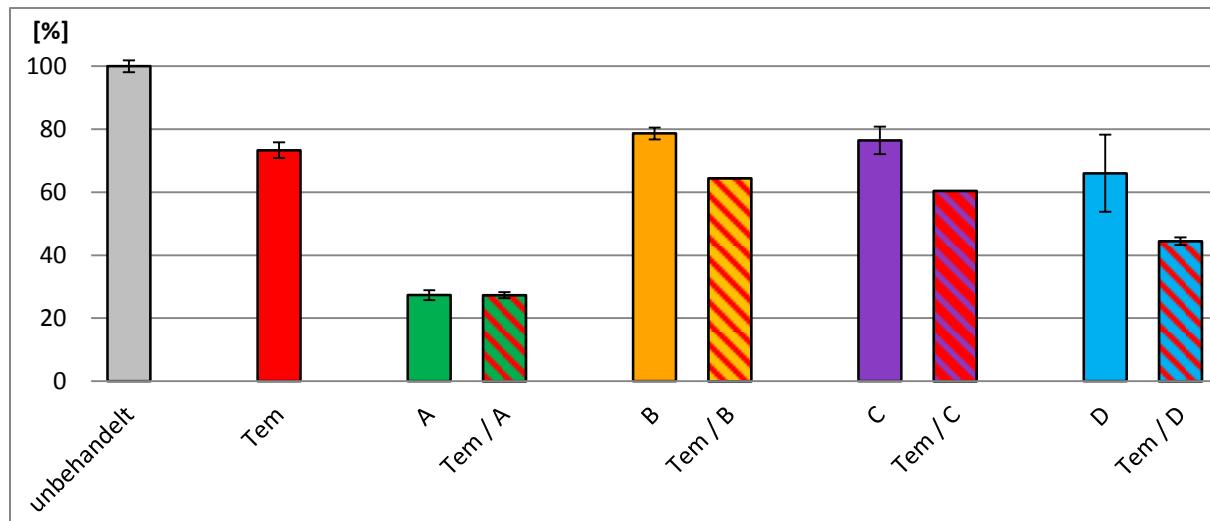
(b)



**Abbildung 17a/b: Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei MAVER-1 ohne und mit Feeder Layer**

Abb. 17a zeigt die Kombinations-Therapie ohne, Abb. 17b die Kombinations-Therapie mit Feeder Layer. Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Temsirolimus (Tem), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Tem/A, Tem/B, Tem/C und Tem/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinie MAVER-1 (auf Feeder Layer Zellen) kultiviert und für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Somit zeigte sich insgesamt ein stärkerer Effekt der Kombinations-Therapien mit Temsirolimus auf Feeder Layer.



**Abbildung 17c: Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei BALL-1 auf Feeder Layer**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Temsirolimus (Tem), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Tem/A, Tem/B, Tem/C und Tem/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der ALL-Zelllinie BALL-1 auf Feeder Layer Zellen kultiviert und für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Die Ergebnisse der Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 auf Feeder Layer sind in Abb. 17c dargestellt. Die Ergebnisse ohne Feeder Layer wurden bereits unter 5.3.3.1 beschrieben und in Abb. 16b dargestellt. Es fand sich nach der Behandlung mit Temsirolimus ein um  $26,7\% \pm 2,5$  verringertes Zellwachstum im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen. Die Zellen reagierten ebenfalls sensibel auf Monotherapie mit Cytarabin, Bendamustin, Cisplatin und Dexamethason (siehe 5.1.3.2). Die Kombination von Cytarabin und Temsirolimus (Tem/A) zeigte eine um  $72,7\% \pm 0,9$ , Tem/B eine um  $35,6\% \pm 0,0$  und Tem/C eine um  $39,6\% \pm 0,0$  verringerte Proliferation. Durch die Kombinations-Therapie mit Dexamethason und Temsirolimus (Tem/D) konnte das Zellwachstum um  $55,6\% \pm 1,3$  verringert werden.

In Tabelle 12 werden die Fraction of Product-Ergebnisse für die Kombinations-Therapie mit Temsirolimus ohne und mit Feeder Layer dargestellt.

	<b>Tem/A</b>	<b>Tem/B</b>	<b>Tem/C</b>	<b>Tem/D</b>
MAVER-1	<b>- 0,19</b>	- 0,05	- 0,01	<b>- 0,12</b>
BALL-1	- 0,05	- 0,06	- 0,05	- 0,04
MAVER-1	- 0,08	0,02	0,06	0,05
BALL-1	- 0,07	- 0,07	- 0,04	0,04

**Tabelle 12: Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Temsirolimus ohne und mit Feeder Layer**

Normal gedruckte Werte stehen für additive Effekte der verwendeten Medikamentenkombinationen, fett gedruckte Werte zeigen antagonistische Effekte. Weiß hinterlegt sind die Ergebnisse der Versuche ohne Feeder Layer, die Ergebnisse mit Feeder Layer sind hellblau hinterlegt.

Alle verwendeten Medikamenten-Kombinationen (Tem/A, Tem/B, Tem/C, Tem/D) zeigten bei den beiden auf Feeder Layer kultivierten Zelllinien additive Effekte.

Im Vergleich dazu ergaben sich bei MAVER-1 durch die Errechnung der Fraction of Product Additivismen für die Kombinationen Tem/B und Tem/C, aber Antagonismen für die Kombinationen Tem/A und Tem/D. Für die Vergleichs-Zelllinie BALL-1 ergaben sich ohne Feeder Layer in allen Kombinationen additive Effekte.

### 5.3.4 FACS-Analysen

#### 5.3.4.1 Apoptose

Es wurden behandelte und unbehandelte Zellen der Zelllinien Rec-1 und BALL-1 mittels Durchflusszytometer analysiert und auf Apoptose gescreent. Die gemessenen Zellen wurden in Anteile aus lebenden, früh- und spät-apoptotischen Zellen aufgeteilt.

Bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 ergab sich bei keiner der verwendeten Mono- oder Kombinations-Therapien eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Bei der MCL-Zelllinie Rec-1 zeigte sich durch Monotherapie mit Temsirolimus, Cytarabin, Bendamustin und Cisplatin ebenfalls keine erhöhte Apoptoserate. Auch die Kombinations-Therapie mit Tem/A, Tem/B und Tem/C erzielte keine gesteigerte Apoptoserate. Lediglich durch Therapie mit Dexamethason

(D) und die Kombination mit Temsirolimus (Tem/D) konnten vermehrt apoptotische Zellen beobachtet werden. Bei den unbehandelten Kontroll-Zellen waren insgesamt 5,8% der Zellen apoptotisch (früh- und spät-apoptotisch), nach der Monotherapie mit Dexamethason 12,3% und nach der Kombinations-Therapie Tem/D fanden sich 14,3% apoptotische Zellen. Hier zeigt sich, dass die Kombinations-Therapie Tem/D, im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen, zu 8,5% mehr apoptotischen Zellen führte.

In Tabelle 13 sind die Apoptose-Daten der MCL-Zelllinie Rec-1 aufgeführt.

	<b>lebend</b>	<b>früh</b>	<b>spät</b>
unbehandelt	89,3%	0,6%	5,2%
Tem	89,9%	0,8%	5,8%
A	87,6%	1,4%	7,4%
Tem/A	86,5%	1,0%	7,7%
B	88,1%	1,2%	7,4%
Tem/B	89,1%	1,2%	6,5%
C	90,9%	0,9%	5,6%
Tem/C	90,5%	0,8%	5,8%
D	84,9%	1,7%	10,6%
Tem/D	83,9%	1,8%	12,6%

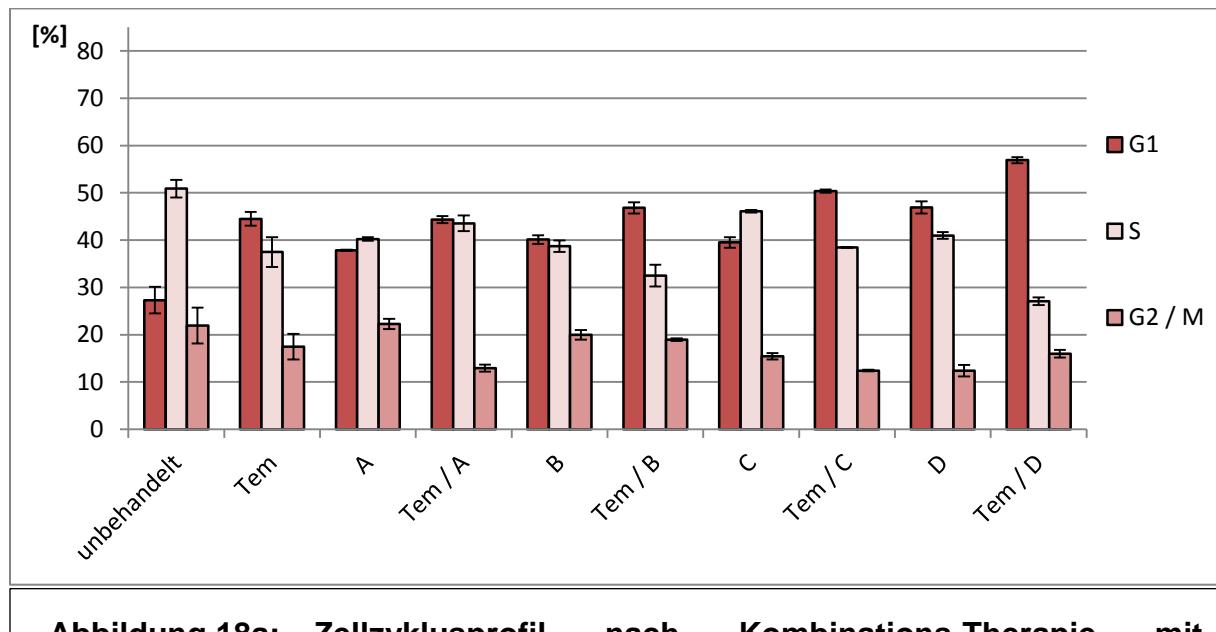
**Tabelle 13: Apoptose-FACS Daten nach 48 Stunden bei Rec-1**

Es handelt sich um die gemessenen Absolut-Werte in %, angegeben sind jeweils die Anteile der lebenden, der früh- und spät-apoptotischen Zellen der Zelllinie Rec-1. Gezeigt werden die Werte der unbehandelten Kontroll-Zellen und der behandelten Zellen mit folgenden Medikamenten und deren Kombinationen: Temsirolimus (Tem), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C) und Dexamethason (D). Es wurden jeweils in 2 voneinander unabhängigen Experimenten mindestens 10000 Zellen im Durchflusszytometer 48 Stunden nach Behandlung analysiert.

### 5.3.4.2 Änderungen im Zellzyklusprofil

Die eingesetzten Medikamente und deren Kombination untereinander führten zu Änderungen im Zellzyklusprofil. Dies wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bei den Zelllinien Rec-1 und BALL-1 analysiert.

Die gemessenen Daten der MCL-Zelllinie Rec-1 werden in Abb. 18a graphisch dargestellt.



**Abbildung 18a: Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei Rec-1**

Auf der Y-Achse finden sich die Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen in %. Auf der X-Achse sind die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Temsirolimus (Tem), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Tem/A, Tem/B, Tem/C und Tem/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der Zelllinie Rec-1 für jeweils 48 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

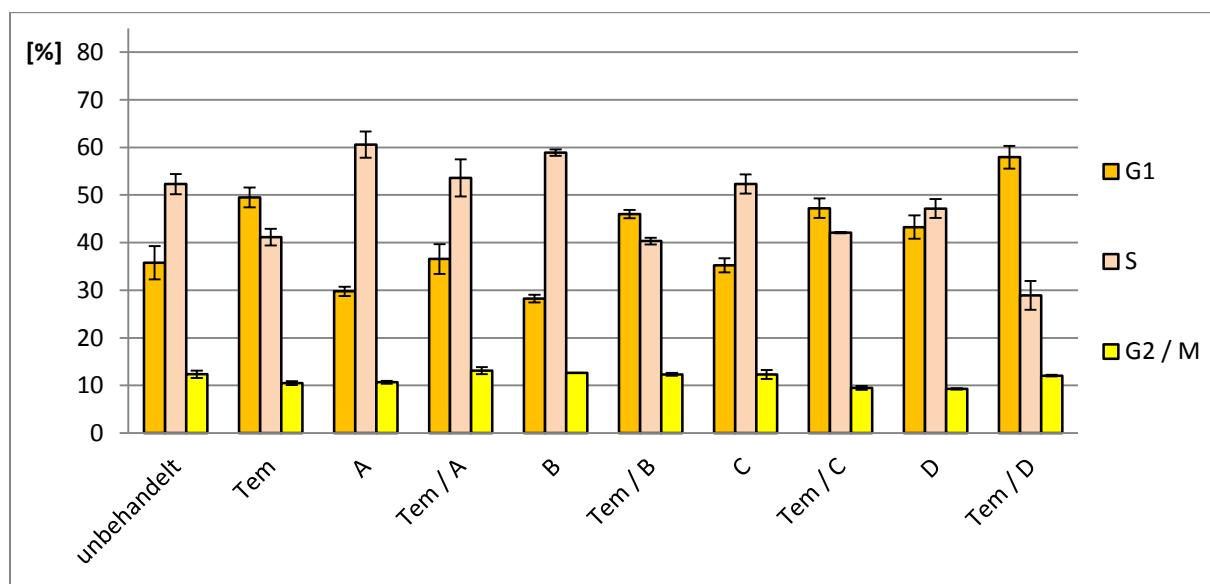
Die unbehandelten Kontroll-Zellen bei Rec-1 zeigten folgende prozentuale Verteilung auf die Zellzyklusphasen:  $27,3\% \pm 2,8$  in der G1-Phase,  $50,9\% \pm 1,9$  in der S-Phase und  $21,9\% \pm 3,8$  in der G2/M-Phase. Nach der Behandlung mit Mono- oder Kombinations-Therapie fand sich in allen Fällen ein Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Nach Therapie mit Temsirolimus war der Anteil der Zellen in der G1-Phase um  $17,2\% \pm 1,5$  erhöht, nach Cytarabin um  $10,5\% \pm 0,1$ , nach Bendamustin um  $12,8\% \pm 0,9$ , nach Cisplatin um  $12,2\% \pm 1,1$  und nach Monotherapie mit Dexamethason um  $19,6\% \pm 1,3$ . Die Kombinations-Therapie mit Tem/A führte zu  $17,0\% \pm 0,8$  mehr Zellen in der G1-Phase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, nach Tem/B waren es  $19,5\% \pm 1,2$ , nach Tem/C  $23,1\% \pm 0,3$  und nach Tem/D  $29,6\% \pm 0,6$  mehr Zellen in der G1-Phase.

Zusammenfassend führte Temsirolimus in Mono- und Kombinationstherapie bei der MCL-Zelllinie Rec-1 zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase.

Ähnliche Ergebnisse ließen sich bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 beobachten. Bei den unbehandelten Zellen von BALL-1 befanden sich  $35,8\% \pm 3,5$  in der G1-Phase,  $52,3\% \pm 2,1$  in der S-Phase und  $12,4\% \pm 0,7$  in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Nach

Therapie mit Temsirolimus war der Anteil der Zellen in der G1-Phase um  $13,7\% \pm 2,1$  erhöht. Nach Cytarabin befanden sich  $8,1\% \pm 2,7$  mehr Zellen in der S-Phase., nach Bendamustin  $6,6\% \pm 0,7$ . Cisplatin führte zu keiner Veränderung des Zellzyklusprofils. Nach Dexamethason war der Zell-Anteil in der G1-Phase um  $7,5\% \pm 2,4$  erhöht. Nach Therapie mit Tem/A zeigte sich kein verändertes Zellzyklusprofil. Nach Tem/B befanden sich in der G1-Phase  $10,2\% \pm 0,9$  mehr Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, nach Tem/C waren es  $11,5\% \pm 2,0$  mehr und nach Tem/D waren sogar  $22,1\% \pm 2,4$  mehr Zellen in der G1-Phase.

Die Zellzyklus-Daten der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 sind in Abb. 18b aufgeführt.



**Abbildung 18b: Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei BALL-1**

Auf der Y-Achse finden sich die Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen in %. Auf der X-Achse sind die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Temsirolimus (Tem), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Tem/A, Tem/B, Tem/C und Tem/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der ALL-Zelllinie BALL-1 für jeweils 48 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

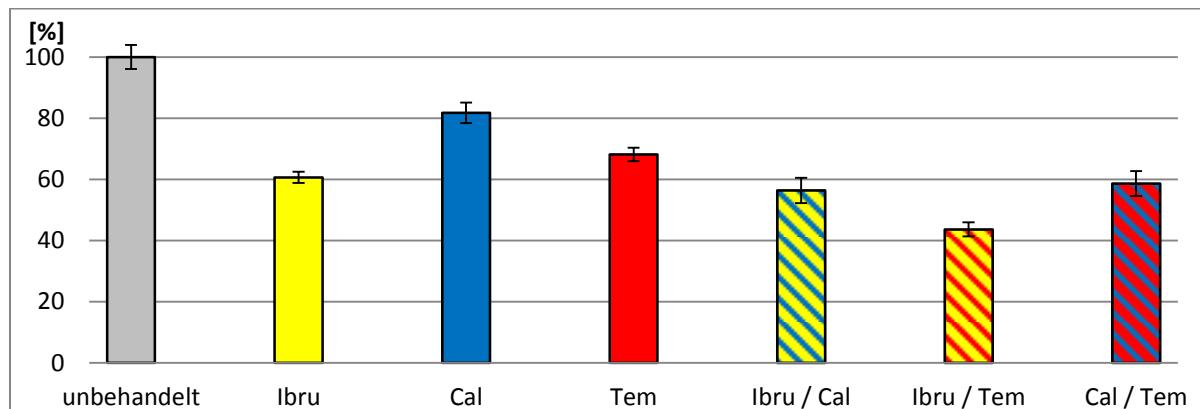
## 5.4 Kombinations-Therapie der Inhibitoren

### 5.4.1 Kombinationassays

#### 5.4.1.1 Kombinations-Therapie ohne Feeder Layer

Hier wurden die Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus in Mono- und Kombinations-Therapie verwendet. Es sollte ermittelt werden ob sich durch die gleichzeitige Gabe additive, synergistische oder antagonistische Effekte zeigen. Die Experimente wurden mit allen 7 Zelllinien durchgeführt.

Abb. 19a zeigt die Ergebnisse der Inhibitor-Kombinations-Therapie anhand der MCL-Zelllinie Rec-1.

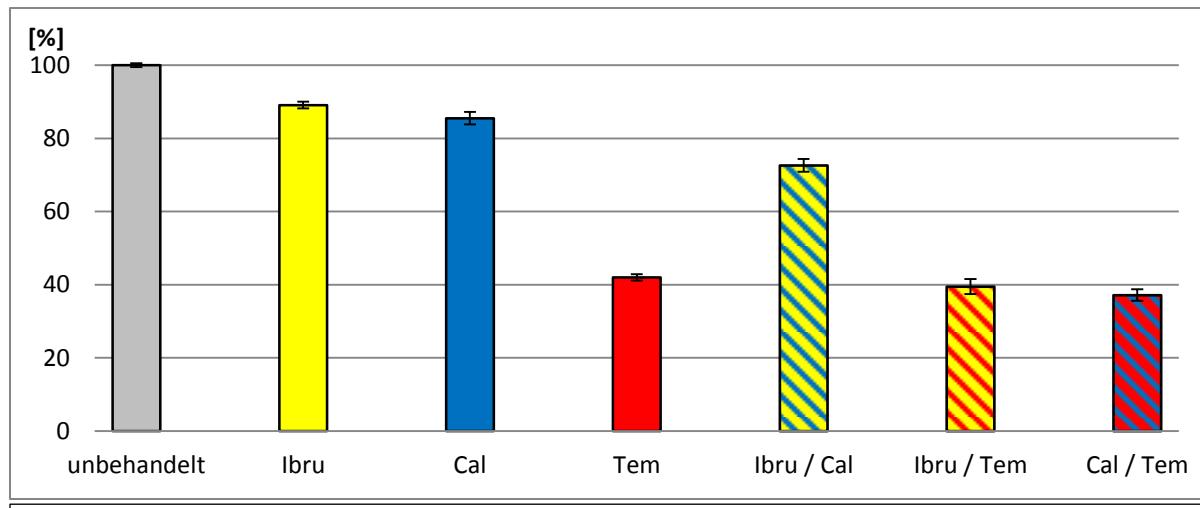


**Abbildung 19a: Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei Rec-1**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Idelalisib (Cal), Temsirolimus (Tem) und deren Kombinationen Ibru/Cal, Ibru/Tem und Cal/Tem behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinie Rec-1 für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Rec-1 zeigte sich in der Monotherapie sensibel auf die Behandlung mit 10 nM Ibrutinib (Wachstumshemmung:  $39,4\% \pm 1,9$ ), mit 5  $\mu$ M Idelalisib (Wachstumshemmung:  $18,3\% \pm 3,4$ ) und mit 10 nM Temsirolimus (Wachstumshemmung:  $31,9\% \pm 2,2$ ). Nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib und Idelalisib (Ibru/Cal) war die Proliferation im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen um  $43,6\% \pm 4,1$  eingeschränkt, nach Ibru/Tem um  $56,4\% \pm 2,3$  und nach Cal/Tem um  $41,4\% \pm 4,1$ .

In Abb. 19b sind nun die Daten der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 dargestellt.



**Abbildung 19b: Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei BALL-1**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Idelalisib (Cal), Temsirolimus (Tem) und deren Kombinationen Ibru/Cal, Ibru/Tem und Cal/Tem behandelten Zellen. Es wurden Zellen der ALL-Zelllinie BALL-1 für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Die Zellen zeigten sich in der Monotherapie sensibel auf die Behandlung mit 10 nM Ibrutinib (Wachstumshemmung:  $10,9\% \pm 0,9$ ), mit 5  $\mu$ M Idelalisib (Wachstumshemmung:  $14,5\% \pm 1,7$ ) und mit 10 nM Temsirolimus (Wachstumshemmung:  $58,0\% \pm 0,9$ ). Nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib und Idelalisib (Ibru/Cal) war die Proliferation im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen um  $27,4\% \pm 1,7$  eingeschränkt, nach Ibru/Tem um  $60,5\% \pm 2,0$  und nach Cal/Tem um  $62,9\% \pm 1,6$ .

Die Errechnung der Fraction of Product zeigte, dass alle verwendeten Kombinationen sowohl bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1, als auch bei der MCL-Zelllinie Rec-1 additive Effekte bewirken.

Die Medikamenten-Kombinationen Ibru/Cal und Ibru/Tem zeigten außer in MAVER-1 bei 6 von 7 Zelllinien einen additiven Effekt. Die Kombination Cal/Tem war bis auf MAVER-1 und Granta 519 in 5 von 7 Zelllinien additiv.

Die Ergebnisse aller Zelllinien nach Errechnung der Fraction of Product sind in Tabelle 14 aufgeführt.

	Ibru/Cal	Ibru/Tem	Cal/Tem
Z-138	- 0,02	0,04	0,00
JeKo-1	- 0,07	- 0,05	- 0,09
Mino	0,06	- 0,01	0,03
Rec-1	- 0,07	- 0,02	- 0,03
MAVER-1	<b>- 0,11</b>	<b>- 0,12</b>	<b>- 0,14</b>
Granta 519	- 0,05	0,06	<u>0,10</u>
BALL-1	0,04	- 0,02	- 0,01

**Tabelle 14: Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus**

Fett und unterstrichen gedruckte Werte zeigen einen synergistischen Effekt, normal gedruckte Werte zeigen Additivismen und fett gedruckte Werte Antagonismen.

#### 5.4.1.2 Kombinations-Therapie ohne und mit Feeder Layer

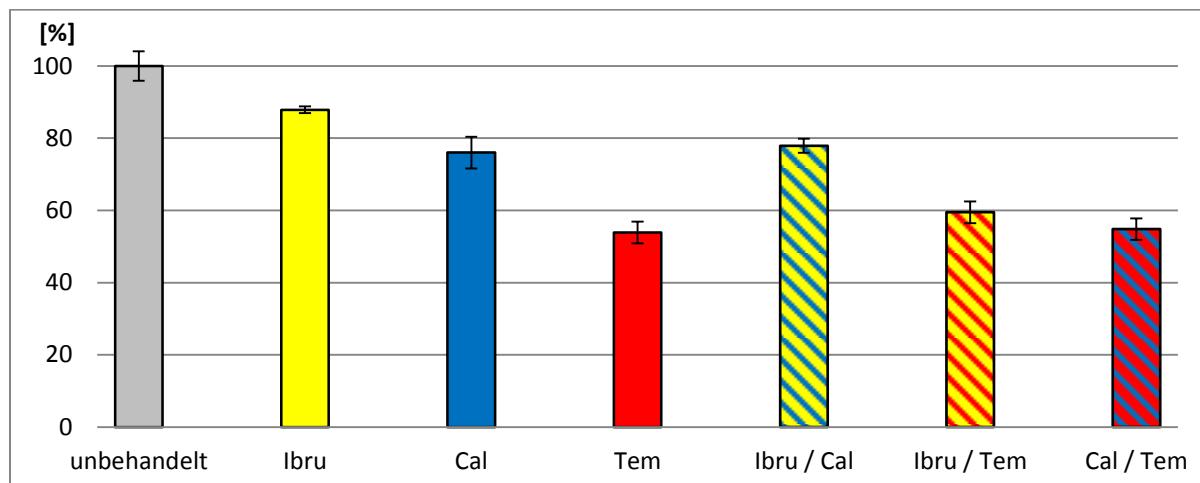
Mit MAVER-1- und BALL-1-Zellen wurden in dieser Arbeit noch weitere Experimente auf Feeder Layer Zellen durchgeführt. So sollte beurteilt werden ob eine Aktivierung der MCL- oder ALL-Zellen durch die Wachstumsfaktoren des Feeder Layers zu veränderten therapeutischen Effekten von Ibrutinib, Idelalisib Temsirolimus oder deren Kombinationen führt. Die Kombinations-Therapie mit den verwendeten Inhibitoren ohne und mit Feeder Layer wird im Folgenden anhand beider Zelllinien graphisch dargestellt.

Abb. 20 zeigt die Ergebnisse der MCL-Zelllinie MAVER-1 nach Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren ohne und mit Feeder Layer.

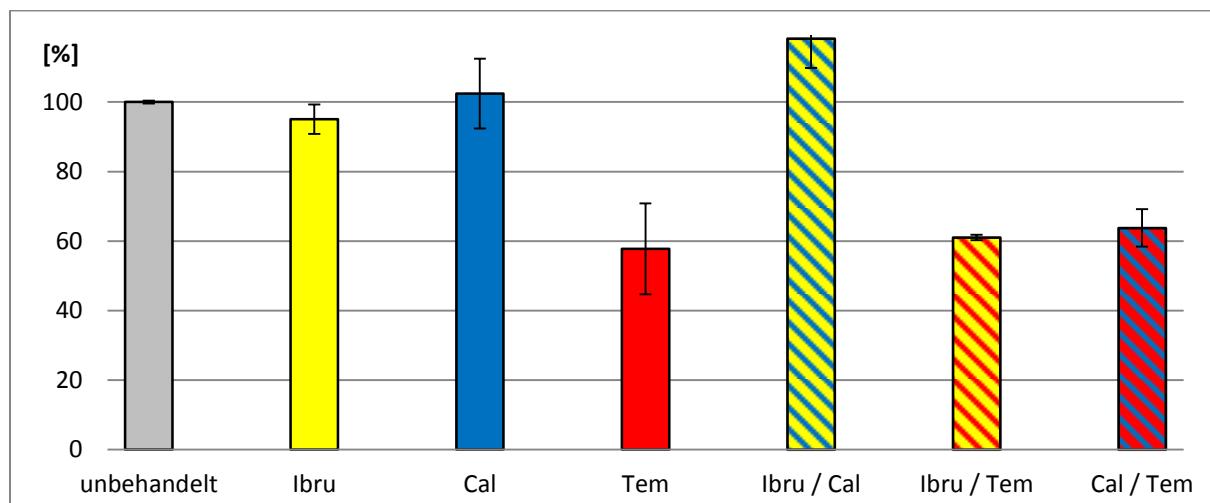
In Abb. 20a wird die Kombinations-Therapie ohne Feeder Layer dargestellt. Hier zeigten sich die Zellen in der Monotherapie sensibel auf die Behandlung mit 10 nM Ibrutinib (Wachstumshemmung: 12,2%  $\pm$ 0,9, mit 5  $\mu$ M Idelalisib (Wachstumshemmung: 23,9%  $\pm$ 4,4 und mit 10 nM Temsirolimus (Wachstumshemmung: 46,1%  $\pm$ 3,0. Nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib und Idelalisib (Ibru/Cal) war die Proliferation im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-

Zellen um  $22,1\% \pm 1,9$  eingeschränkt, nach Ibru/Tem um  $40,5\% \pm 3,0$  und nach Cal/Tem um  $45,2\% \pm 3,0$ .

**(a)**



**(b)**



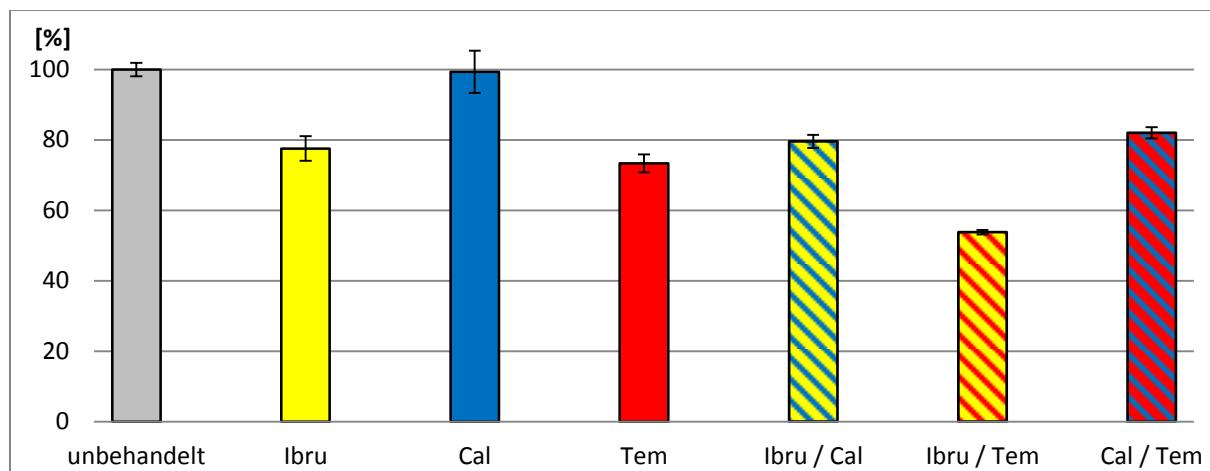
**Abbildung 20a/b: Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei MAVER-1 ohne und mit Feeder Layer**

Abb. 20a zeigt die Kombinations-Therapie ohne, Abb. 20b die Kombinations-Therapie mit Feeder Layer. Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die un behandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Idelalisib (Cal), Temsirolimus (Tem) und deren Kombinationen Ibru/Cal, Ibru/Tem und Cal/Tem behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinie MAVER-1 (auf Feeder Layer) kultiviert und für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Abb. 20b zeigt hingegen die Kombinations-Therapie der Inhibitoren anhand der MCL-Zelllinie MAVER-1 auf Feeder Layer. Hier ergab sich in der Monotherapie mit Ibrutinib ein um  $4,9\% \pm 4,2$  verringertes Zellwachstum im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen. Die Therapie mit Temsirolimus zeigte eine

Verminderung um  $42,2\% \pm 13,1$ , Idelalisib zeigte hingegen keine verminderte Proliferation. Die Kombination von Ibrutinib und Idelalisib (Ibru/Cal) zeigte keine Wachstumshemmung, Ibru/Tem eine um  $38,9\% \pm 0,8$  verringerte Proliferation und Cal/Tem erzielte eine relative Zellzahlreduktion von  $36,2\% \pm 5,4$ .

Die Ergebnisse der Kombinations-Therapie ohne Feeder Layer bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 wurden unter 5.4.1.1 bereits beschrieben und in Abb. 19b dargestellt. Die Ergebnisse der Kombinations-Therapie der Inhibitoren auf Feeder Layer werden in Abb. 20c gezeigt.



**Abbildung 20c: Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei BALL-1 auf Feeder Layer**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Idelalisib (Cal), Temsirolimus (Tem) und deren Kombinationen Ibru/Cal, Ibru/Tem und Cal/Tem behandelten Zellen. Es wurden Zellen der Zelllinie BALL-1 auf Feeder Layer kultiviert und für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Bei der Kombinations-Therapie der Inhibitoren bei BALL-1 auf Feeder Layer ergab sich in der Monotherapie mit Ibrutinib ein um  $22,4\% \pm 3,5$  verringertes Zellwachstum im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen. Die Therapie mit Temsirolimus zeigte eine Verminderung um  $26,7\% \pm 2,5$ , Idelalisib zeigte hingegen keine verminderte Proliferation. Die Kombination von Ibrutinib und Idelalisib (Ibru/Cal) zeigte eine Wachstumshemmung von  $20,4\% \pm 1,9$ , Ibru/Tem eine um  $46,2\% \pm 0,6$  verringerte Proliferation und Cal/Tem erzielte eine relative Zellzahlreduktion von  $18,0\% \pm 1,6$ .

Die Ergebnisse für BALL-1 und MAVER-1 nach Kombinations-Therapie der Inhibitoren ohne und mit Feeder Layer sind nun in Tabelle 15 dargestellt.

	Ibru/Cal	Ibru/Tem	Cal/Tem
MAVER-1	<b>- 0,11</b>	<b>- 0,12</b>	<b>- 0,14</b>
BALL-1	0,04	- 0,02	- 0,01
MAVER-1	<b>- 0,21</b>	- 0,06	- 0,05
BALL-1	- 0,03	0,03	- 0,09

**Tabelle 15: Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus ohne und mit Feeder Layer**

Normal gedruckte Werte stehen für additive Effekte, fett gedruckte Werte zeigen Antagonismen. Weiß hinterlegt sind die Ergebnisse der Versuche ohne Feeder Layer, die Ergebnisse mit Feeder Layer sind hellblau hinterlegt.

Durch die Errechnung der Fraction of Product ergaben sich für die Vergleichs-Zelllinie BALL-1 ausschließlich additive Effekte. Für die MCL-Zelllinie MAVER-1 zeigten sich Additivitäten für die Kombination von Temsirolimus mit Ibrutinib (Ibru/Tem) und Idelalisib (Cal/Tem). Die gemeinsame Gabe von Ibrutinib und Idelalisib (Ibru/Cal) ergab einen Antagonismus.

Im Vergleich dazu ergaben sich bei MAVER-1 ohne Feeder Layer in allen Kombinationen antagonistische Effekte. Bei BALL-1 ergaben sich mit und ohne Feeder Layer in allen Kombinationen additive Effekte.

## 5.4.2 FACS-Analysen

### 5.4.2.1 Apoptose

Bei den verwendeten Zelllinien Rec-1 und BALL-1 ergab sich nach 48 Stunden Therapie in keiner der Mono- (Ibru, Cal, Tem) oder Kombinations-Therapien (Ibru/Cal, Ibru/Tem, Cal/Tem) eine höhere Apoptoserate als bei den unbehandelten Zellen.

### 5.4.2.2 Änderungen im Zellzyklusprofil

Durch die verwendeten Therapeutika und deren Kombination ergaben sich Änderungen im Zellzyklusprofil welche im Durchflusszytometer analysiert wurden. In

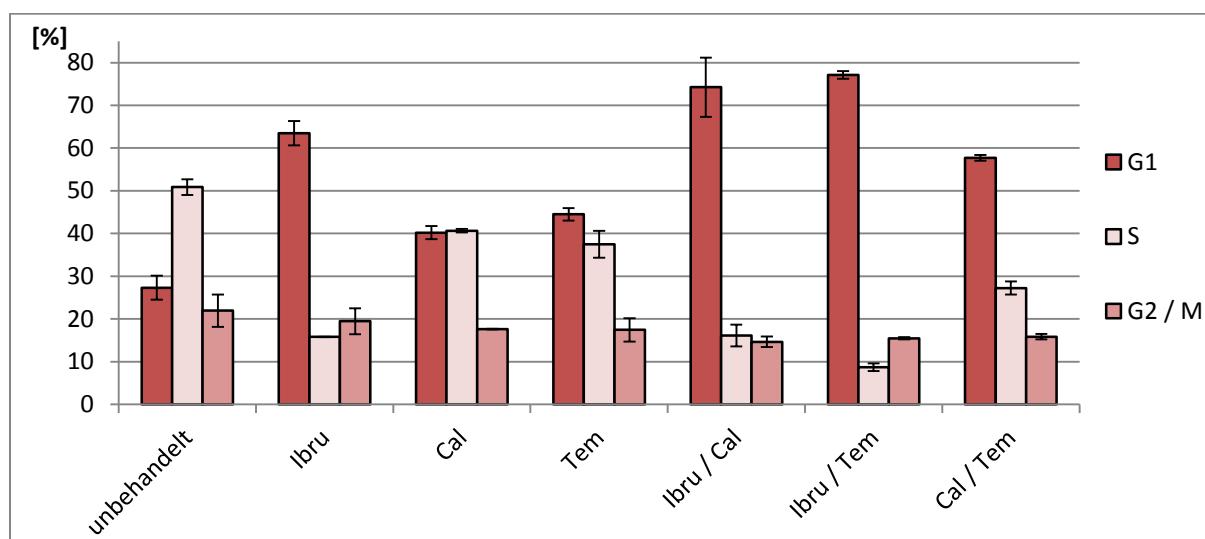
dieser Arbeit wurden die FACS-Analysen bei den Zelllinien Rec-1 und BALL-1 durchgeführt.

In Abb. 21a werden zur Verdeutlichung die Daten graphisch anhand der MCL-Zelllinie Rec-1 dargestellt.

Hier zeigten die unbehandelten Kontroll-Zellen eine Verteilung von  $27,3\% \pm 2,8$  in der G1-Phase des Zellzyklus,  $50,9\% \pm 1,9$  in der S-Phase und  $21,9\% \pm 3,8$  in der G2/M-Phase.

Die 48-stündige Behandlung der MCL-Zellen mit den Inhibitoren und deren Kombinationen führte in allen Fällen zu einem G1-Arrest. Nach Therapie mit Ibrutinib befanden sich  $36,2\% \pm 2,9$  mehr Zellen in der G1-Phase, Idelalisib führte zu einem um  $12,9\% \pm 1,5$  erhöhten Anteil der Zellen und Temsirolimus bewirkte eine Steigerung um  $17,2\% \pm 1,5$ . Durch die Kombinations-Therapie mit Ibru/Cal erhöhte sich der Anteil der Zellen in der G1-Phase um  $46,9\% \pm 6,9$ , durch Ibru/Tem um  $49,8\% \pm 0,9$  und durch Cal/Tem um  $30,4\% \pm 0,7$ .

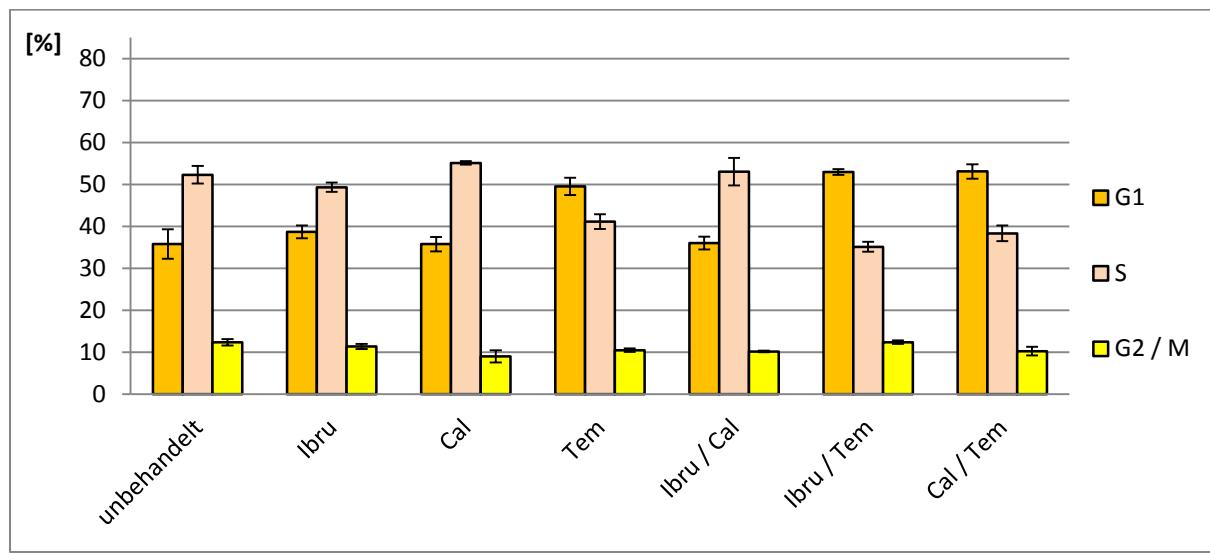
Die Kombination der beiden Inhibitoren Ibrutinib und Temsirolimus (Ibru/Tem) zeigte somit den stärksten G1-Arrest und die größten Veränderungen im Zellzyklusprofil, in der Monotherapie zeigte sich Ibrutinib am effektivsten.



**Abbildung 21a: Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei Rec-1**

Auf der Y-Achse finden sich die Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen in %. Auf der X-Achse sind die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Idelalisib (Cal), Temsirolimus (Tem) und deren Kombinationen Ibru/Cal, Ibru/Tem und Cal/Tem behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinie Rec-1 für jeweils 48 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 ergaben sich die in Abb. 21b dargestellten Veränderungen des Zellzyklusprofils nach Kombinations-Therapie der Inhibitoren.



**Abbildung 21b: Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei BALL-1**

Auf der Y-Achse finden sich die Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen in %. Auf der X-Achse sind die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Idelalisib (Cal), Temsirolimus (Tem) und deren Kombinationen Ibru/Cal, Ibru/Tem und Cal/Tem behandelten Zellen. Es wurden Zellen der ALL-Zelllinie BALL-1 für jeweils 48 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

Die unbehandelten Kontroll-Zellen zeigten eine Verteilung von  $35,8\% \pm 3,5$  in der G1-Phase des Zellzyklus,  $52,3\% \pm 2,1$  in der S-Phase und  $12,6\% \pm 0,7$  in der G2/M-Phase.

Die 48-stündige Behandlung der ALL-Zellen mit Ibrutinib führte zu einem minimalen G1-Arrest mit einem um  $2,9\% \pm 1,5$  erhöhten Zell-Anteil in der G1-Phase. Nach Therapie mit Idelalisib zeigte sich keine Änderung des Zellzyklusprofils. Temsirolimus bewirkte eine Steigerung um  $13,7\% \pm 2,1$  in der G1-Phase. Durch die Kombinations-Therapie mit Ibru/Cal veränderte sich das Zellzyklusprofil, im Vergleich mit den unbehandelten Kontroll-Zellen, nicht. Durch Ibru/Tem erhöhte sich der Zell-Anteil in der G1-Phase um  $17,2\% \pm 0,7$  und durch Cal/Tem um  $17,3\% \pm 1,7$ . Die Kombination des Inhibitors Temsirolimus mit Ibrutinib (Ibru/Tem) oder Idelalisib (Cal/Tem) zeigte somit den stärksten G1-Arrest und die größten Veränderungen im Zellzyklusprofil. Insgesamt waren die Veränderungen, verglichen mit der MCL-Zelllinie Rec-1, lediglich marginal.

## 6 Diskussion

Das Mantelzell-Lymphom ist eines der aggressivsten Lymphome mit kurzen Überlebenszeiten, trotz initial gutem Ansprechen auf die konventionelle Chemotherapie. [7] Hinzu kommt, dass es sich um eine heterogene Erkrankung mit sehr variablen klinischen Verläufen handelt. Es gilt also diejenigen Patienten zu identifizieren, die auf die zur Verfügung stehenden Therapie-Schemata mit hoher Wahrscheinlichkeit am besten ansprechen. [6] Da es nach Erstlinientherapie in fast allen Fällen zu einem Rezidiv der Erkrankung kommt, oder sich das Lymphom von vornehmlich als therapierefraktär erweist, ist es essentiell die Rezidiv-Therapie zu optimieren. Dies wird, basierend auf dem immer besseren Verständnis der Pathogenese, mit der Entwicklung gezielter Therapeutika versucht. Es konnten mittlerweile einige vielversprechende Medikamente für die Mono- und Kombinations-Therapie beim rezidivierten MCL entwickelt werden. [9]

In dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit 3 dieser Therapeutika (Ibrutinib – BTK-Inhibitor, Idelalisib – PI3K-Inhibitor, Temsirolimus – mTOR-Inhibitor) in vitro analysiert.

### 6.1 Ibrutinib

Zunächst konnte eine dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung durch Ibrutinib gezeigt werden. Alle Zelllinien wurden mit 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM und 10 µM behandelt. Bei den MCL-Linien Mino, Granta 519 und Z-138 konnte keine Zellzahlreduktion beobachtet werden. Sie gelten daher als resistente Zelllinien. Sensibel reagierten JeKo-1, MAVER-1 und Rec-1 sowie die ALL-Zelllinie BALL-1. Besonders gut ließ sich die zeit- und dosisabhängige Wirkung bei der sensiblen MCL-Zelllinie Rec-1 darstellen. Der therapeutische Effekt bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 fiel deutlich schwächer aus und war eher mit der beobachteten Wirkung bei JeKo-1 und MAVER-1 vergleichbar. Der dosis- und zeitabhängige therapeutische Effekt von Ibrutinib ist daher nicht als MCL-spezifisch einzustufen. Jedoch scheinen bestimmte Mantelzell-Lymphome äußerst sensibel auf die irreversible Hemmung der BTK (Bruton's tyrosine kinase) zu reagieren. Ibrutinib wird mittlerweile bei einigen Entitäten erfolgreich als Therapeutikum eingesetzt. Seit 2014 ist das Medikament für die Rezidiv-Therapie des MCL und der CLL zugelassen. Bei beiden Entitäten handelt

es sich um B-Zell-Neoplasien. [51, 59, 84, 92, 93, 123-125] Es sollte jedoch eruiert werden bei welchen MCL-Patienten der Einsatz dieses Medikamentes sinnvoll ist. Rahal et al. [126] zeigten, dass MCL-Zelllinien in welchen eine B-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung des klassischen NF-κB-Signalweges vorliegt, z.B. aufgrund von Mutationen der beteiligten Moleküle, in vitro höchst sensibel auf die Therapie mit Ibrutinib reagieren. Als Ibrutinib-resistent erwiesen sich hingegen Zelllinien in denen der alternative NF-κB-Signalweg aktiviert vorlag. Es konnten, durch Analyse von 165 MCL-Patienten-Proben, bestimmte Mutationen des alternativen NF-κB-Signalweges identifiziert werden die zur Ibrutinib-Resistenz führten. Dieses Wissen könnte sich bei MCL-Patienten vor Therapiebeginn nutzen lassen, um voraussagen zu können ob sich das MCL Ibrutinib-sensibel oder -resistant verhält. Konsequenterweise wäre es also sinnvoll vor Therapiebeginn einen entsprechenden Nachweis in die Standard-Diagnostik zu integrieren. [126] Auf der anderen Seite ist in vivo eine viel größere Anzahl von Fällen auf Ibrutinib empfindlich.

## 6.2 Zytostatika

In der Therapie des MCL haben sich bisher verschiedene Therapie-Regime bewährt. In dieser Arbeit wurden die verwendeten Inhibitoren daher mit folgenden Zytostatika kombiniert: Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D). Sie finden ihren Einsatz in der Erstlinien-Therapie des MCL. Bei jüngeren Patienten wird das R-DHAP-Regime (Rituximab, Dexamethason, Cytarabin, Cisplatin) angewendet. Zudem wird Cytarabin auch zusätzlich zum R-CHOP-Therapie-Regime als Hochdosis-Induktions-Therapie bei jüngeren, fitten Patienten eingesetzt. Das BR- (Bendamustin, Rituximab) und das R-BAC-Regime (Rituximab, Bendamustin, Cytarabin) haben sich bei älteren Patienten bewährt. [14]

In der Rezidiv-Therapie werden ebenfalls Therapie-Schemata wie R-CHOP und R-BAC verwendet. Der Schwerpunkt liegt aber in der Kombinations-Therapie konventioneller Chemo-Immunotherapie mit molekular gezielt wirkenden Inhibitoren. Die einzige potentiell kurative Therapie bleibt die allogene Stammzelltransplantation, diese ist allerdings mit einem großen therapiebedingten Risiko und einer hohen Mortalität vergesellschaftet. [5, 14]

### 6.2.1 Kombinations-Therapie mit Ibrutinib

In vitro wurde Ibrutinib (Ibru) in dieser Arbeit mit Cytarabin (Ibru/A), Bendamustin (Ibru/B), Cisplatin (Ibru/C) und Dexamethason (Ibru/D) kombiniert. Nach der Fraction of Product Errechnung nach Webb et al. [121] zeigten nahezu alle Kombinations-Therapien additive Effekte bei den MCL-Zelllinien. Die Vergleichs-Zelllinie BALL-1 war in der Monotherapie sowohl Ibrutinib- als auch Chemo-sensibel. Die Medikamentenkombinationen erwiesen sich auch hier als additiv. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die eingesetzten Therapien nicht MCL-spezifisch wirksam sind, sondern ebenfalls gute therapeutische Effekte bei anderen B-Zell-Neoplasien aufweisen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Experimente ergaben für die Vergleichs-Zelllinie BALL-1 in keiner der Mono- und Kombinations-Therapien erhöhte Apoptoseraten im Vergleich mit unbehandelten Zellen. Bei der MCL-Zelllinie Rec-1 fanden sich nur nach Dexamethason-Monotherapie und Ibru/D eine höhere Apoptoserate. Die Monotherapie mit 10 nM Ibrutinib führte zu keiner veränderten Apoptoserate. Cinar et al. [88] konnten in vitro bei den MCL-Zelllinien Mino und JeKo-1 eine deutliche Apoptose-Induktion nach 72-stündiger Behandlung mit 10-20 µM Ibrutinib zeigen. Die fehlende Apoptose-Induktion kann daher mit der weitaus niedrigeren Standarddosierung von 10 nM zusammenhängen, die in dieser Arbeit eingesetzt wurde. Visco et al. [127] konnten anhand von in vitro Versuchen eine Apoptose-Induktion durch Therapie der Zelllinien JeKo-1 und Granta 519 mit Bendamustin und Cytarabin beobachten. Auch hier waren die verwendeten Dosierungen höher als die in dieser Arbeit eingesetzten Standarddosierungen.

Zusätzlich fanden durchflusszytometrische Zellzyklus-Analysen statt. Es konnten, trotz der fehlenden Apoptose-Induktion, sowohl bei der MCL-Zelllinie Rec-1 als auch bei der ALL-Zelllinie BALL-1 Veränderungen des Zellzyklusprofils nach Mono- und Kombinations-Therapie beobachtet werden. Bei Rec-1 induzierten alle eingesetzten Therapien einen G1-Phase-Arrest nach 48-stündiger Behandlung. Am stärksten war dieser Effekt nach Ibrutinib-Monotherapie, nach Ibru/C und Ibru/D. Liu et al. setzten das Immunsuppressivum FTY720 in vitro zur Therapie des Mantelzell-Lymphoms ein. Hierbei zeigte sich durch Herunterregulierung von phosphorylierter AKT und Cyclin D1 ein Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase. Ein G1-Arrest nach Behandlung der MCL-Zellen mit Ibrutinib könnte auf ähnlichem Weg entstanden sein, denn Ibrutinib

ist ein Hemmstoff des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges und führt daher zu einer Down-Regulation von AKT.

Die Vergleichs-Zelllinie BALL-1 zeigte deutlich geringere Zellzyklus-Veränderungen. Ein leichter G1-Arrest konnte nach Monotherapie mit Dexamethason und Ibrutinib beobachtet werden. Ibru/D führte zum stärksten G1-Arrest bei BALL-1. Allerdings war dieser Effekt, verglichen mit den Zellzyklus-Daten bei Rec-1, deutlich geringer ausgeprägt. Insgesamt ließen sich bei den ALL-Zellen nach Therapie keine oder nur leichte Zellzyklus-Änderungen zeigen. Visco et al. [127] beschreiben einen Bendamustin- und Cytarabin-induzierten Arrest in der S-Phase des Zellzyklus. Dieser Effekt konnte in dieser Arbeit bei der ALL-Zelllinie BALL-1 kaum beobachtet werden. Bei der MCL-Zelllinie Rec-1 führten die beiden Zytostatika jedoch zu einem Arrest in der G1-Phase, obwohl die verwendeten Medikamenten-Dosierungen viel niedriger waren als die in der von Visco et al. [127] veröffentlichten Arbeit.

Die fehlende Apoptose-Induktion und die geringen Veränderungen des Zellzyklusprofils bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 zeigen, dass Ibrutinib eine weitaus bessere Wirksamkeit bei MCL-Zellen als bei ALL-Zellen hat. Die Proliferation konnte zwar in Mono- und Kombinations-Therapie bei BALL-1 ebenfalls eingeschränkt werden und die Kombinations-Therapie ergab auch additive Effekte, allerdings war der erwartete G1-Arrest nur bei der sensiblen MCL-Linie Rec-1 zu beobachten. Man kann also, auf Grund dieser Daten in gewisser Weise von einem MCL-spezifischen therapeutischen Effekt des BTK-Inhibitors sprechen.

### 6.3 **Idelalisib**

Die MCL- und ALL-Zellen wurden in dieser Arbeit außerdem mit dem PI3K-Inhibitor Idelalisib mit der in der Arbeitsgruppe etablierten Standarddosis von 5 µM 72 Stunden lang behandelt. Eine zeitabhängige Proliferationshemmung konnte bei den sensiblen MCL-Zelllinien Z-138, Rec-1, MAVER-1 und JeKo-1, aber auch bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 beobachtet werden. Die Zelllinien Granta 519 und Mino wurden als therapieresistent eingestuft. Die zeitabhängige Wirkung von Idelalisib ist somit nicht als MCL-spezifisch anzusehen. Dies war allerdings auch nicht zu erwarten, da Idelalisib bereits erfolgreich in der Therapie des folliculären B-Zell-Lymphoms, der CLL und dem B-SLL eingesetzt wird. [98-100]

### 6.3.1 Kombinations-Therapie mit Idelalisib

Der PI3K-Inhibitor wurde des Weiteren mit Cytarabin (Cal/A), Bendamustin (Cal/B), Cisplatin (Cal/C) und Dexamethason (Cal/D) kombiniert. Es ergaben sich nach Errechnung der Fraction of Product in beinahe allen Fällen additive Effekte. Bei der Idelalisib-resistenten MCL-Zelllinie Granta 519 konnte erstaunlicherweise ein synergistischer Effekt durch Kombination des Inhibitors mit Dexamethason beobachtet werden. Bei der MCL-Zelllinie Rec-1 (Idelalisib-sensibel) führte die zusätzliche Gabe des PI3K-Inhibitors bei jeder Kombination zu einer deutlichen Steigerung der Proliferationshemmung. Die Idelalisib-sensibelste Zelllinie JeKo-1 zeigte rechnerisch Antagonismen bei den Kombinationen Cal/B und Cal/C. Hier war die Zellzahlreduktion höher als nach Bendamustin- oder Cisplatin-Monotherapie, aber verglichen mit der Idelalisib-Monotherapie zeigte sich keine zusätzliche Steigerung der Proliferationshemmung. Bei Cal/A und Cal/D war der therapeutische Effekt additiv, die Proliferation konnte durch zusätzliche Gabe des PI3K-Inhibitors verringert werden. Bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 war nicht nur die Idelalisib-Monotherapie, sondern auch die jeweilige Zytostatika-Therapie wirksam. Die kombinierte Gabe erzielte durchweg additive Ergebnisse, wie es auch bei den MCL-Zelllinien der Fall war. So wurde bestätigt, dass der therapeutische Effekt von Idelalisib nicht als MCL-spezifisch einzuordnen ist.

Nach 48-stündiger Behandlung in Mono- und Kombinations-Therapie wurde durchflusszytometrisch analysiert, wie groß der Anteil apoptotischer Zellen bei der ALL-Linie BALL-1 und der MCL-Linie Rec-1 ausfiel. Bei BALL-1 zeigten sich keine apoptotischen Zellen verglichen mit unbehandelten Kontroll-Zellen. Ausschließlich die Dexamethason-Therapie und die Kombinations-Therapie Cal/D führte bei der MCL-Zelllinie Rec-1 zu einer Steigerung der Apoptose. Alle anderen eingesetzten Medikamente und deren Kombinationen führten nicht zum programmierten Zelltod. Lannutti et al. [94] konnten in vitro bei B-ALL-Zellen, DLBCL-Zellen und Zellen des folliculären Lymphoms eine Apoptose-Induktion durch 0,5 und 1  $\mu\text{M}$  Idelalisib nachweisen. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bei den ALL-Zellen der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 trotz der höheren Dosierung von 5  $\mu\text{M}$  nicht beobachtet werden.

Die Zellzyklus-Analysen ergaben bei Rec-1 in allen Fällen einen G1-Arrest. Am deutlichsten war dieser Effekt nach der Behandlung mit Cal/A und Cal/D ausgeprägt. Die Hemmung der PI3K durch Idelalisib führt nachfolgend zu einer Inaktivierung von

AKT und mTOR, sowie zu einer Cyclin D1-Down-Regulation. Idelalisib führt dadurch, ähnlich wie Ibrutinib, zu einem Zellzyklus-Arrest. [6] Bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 konnten hingegen nur geringe Änderungen des Zellzyklusprofils nach 48-stündiger Behandlung festgestellt werden. Nach Monotherapie mit Cisplatin und nach Kombinations-Therapie mit Cal/A, Cal/B und Cal/C konnte überhaupt keine Veränderung des Zellzyklusprofils beobachtet werden. Ein minimal erhöhter Anteil der Zellen in der S-Phase zeigte sich nach Idelalisib-, Cytarabin- und Bendamustin-Monotherapie. Zu einem leichten G1-Arrest führten lediglich Dexamethason und Cal/D. Die ausgeprägten Änderungen des Zellzyklusprofils mit Induktion eines G1-Phase-Arrests durch Behandlung mit Idelalisib sind also als MCL-spezifisch zu betrachten. Interessant ist auch die Tatsache, dass der deutlichste G1-Arrest bei der MCL-Linie Rec-1 durch die einzige Apoptose-induzierenden Kombination Cal/D verursacht wurde.

Alle Ergebnisse gelten jedoch nur für die verwendeten Dosierungen der eingesetzten Therapeutika. Da die Effekte dosisabhängig sind, könnten die verwendeten Dosierungen der Zytostatika zu gering gewählt zu sein.

## 6.4 Temsirolimus

Die besten Ergebnisse wurden in dieser Arbeit mit dem mTOR-Inhibitor Temsirolimus erzielt. Alle verwendeten Zelllinien (MCL und ALL) reagierten auf die Behandlung mit 10 nM (in der Arbeitsgruppe etablierte Standarddosis) sensibel und ließen eine zeitabhängige Proliferationshemmung erkennen. Bei den MCL-Zellen lag die Zellzahlreduktion nach 72-stündiger Behandlung, verglichen mit unbehandelten Kontroll-Zellen, zwischen  $15,5\% \pm 1,9$  und  $49,5\% \pm 1,1$ . Die Vergleichs-Zelllinie BALL-1 reagierte insgesamt am sensibelsten und zeigte eine Proliferationseinschränkung von  $58,0\% \pm 0,9$ . Der beobachtete zeitabhängige therapeutische Effekt von Temsirolimus war daher nicht MCL-spezifisch. Dies wird durch die Tatsache unterstrichen, dass Temsirolimus bereits erfolgreich in der Tumortherapie verschiedenster Entitäten, darunter auch solide Tumoren wie z.B. das Nierenzellkarzinom, eingesetzt wird. [128]

### 6.4.1 Kombinations-Therapie mit Temsirolimus

Auch in der Kombinations-Therapie zeigten sich beinahe alle Zelllinien nicht nur Temsirolimus-, sondern auch Chemo-sensibel. Ausnahmen stellen hier lediglich die

beiden Cisplatin-resistenten MCL-Linien Mino und MAVER-1 dar. In nahezu allen Fällen ergaben sich nach Errechnung der Fraction of Product additive Therapie-Effekte. Bei Z-138, Granta 519, Mino und JeKo-1 waren rechnerisch alle verwendeten Kombinationen additiv und es konnte fast immer eine deutlich gesteigerte Zellzahlreduktion verglichen mit der Zytostatika- und Temsirolimus-Monotherapie beobachtet werden. Lediglich bei JeKo-1 und Mino entsprach die Wirkung von Tem/C nur derjenigen der Temsirolimus-Monotherapie. Bei der MCL-Zelllinie Rec-1 konnten additive Effekte bei den Kombinationen von Cytarabin, Bendamustin und Dexamethason mit Temsirolimus erreicht werden. Tem/C ergab rechnerisch einen Antagonismus. Hier war die Kombinations-Therapie zwar effektiver als die Cisplatin-Monotherapie, aber schlechter als die alleinige Behandlung mit Temsirolimus. Es ergaben sich rechnerisch Antagonismen für Tem/A und Tem/D und Additivismen für Tem/B und Tem/C bei der MCL-Zelllinie MAVER-1. Es konnten hier bei allen Kombinationen bessere Effekte erzielt werden als durch die Zytostatika-Monotherapie. Die Proliferationshemmung entsprach allerdings circa derjenigen der Temsirolimus-Monotherapie.

Bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 konnten durchweg additive therapeutische Effekte beobachtet werden. Alle Kombinationen waren besser als die Monotherapie mit Temsirolimus und auch besser als die Zytostatika-Monotherapie. Eine Mantelzell-Lymphom-spezifische Wirksamkeit dieser Kombinationen kann somit ausgeschlossen werden. Vielmehr ist von einer sehr guten Wirksamkeit bei B-Zell-Neoplasien auszugehen.

Trotz der exzellenten Wirksamkeit aller eingesetzten Medikamente bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 ließ sich durchflusszytometrisch keine erhöhte Apoptoserate beobachten. Bei der MCL-Zelllinie Rec-1 fand sich nur nach Behandlung mit Dexamethason und Tem/D eine leicht erhöhte Apoptoserate. Die Kombinationen Tem/A, Tem/B und Tem/C zeigten keine Veränderung verglichen mit den unbehandelten Kontroll-Zellen. Younes et al. [129] konnten zeigen, dass Temsirolimus und andere mTOR-Inhibitoren bei der in vitro Therapie von MCL-Zelllinien keine Apoptose herbeiführen. Allerdings wird von einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase berichtet. [129-132] Beide Beobachtungen konnten auch durch die Experimente in dieser Arbeit bestätigt werden.

Insgesamt zeigten die Zellzyklus-Analysen nach der 48-stündigen Behandlung bei Rec-1 nach jeder Mono- und Kombinations-Therapie einen G1-Phase-Arrest. Die

stärkste Zellzyklusänderung wurde nach der Kombinations-Therapie mit Tem/D beobachtet. Bei BALL-1 induzierten Temsirolimus und Dexamethason in Monotherapie, sowie die Kombinations-Therapien Tem/B, Tem/C und Tem/D einen leichten G1-Phase-Arrest. Die Kombination Tem/D führte, wie bei Rec-1, zur stärksten Zellzyklusänderung. Cytarabin und Bendamustin führten jeweils zu einem leichten S-Phasen-Arrest, die Cisplatin-Monotherapie und Tem/A veränderten das Zellzyklusprofil nicht. Alles in allem waren die Änderungen des Zellzyklusprofils bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 geringer ausgeprägt als bei der MCL-Zelllinie Rec-1. Daher kann man davon ausgehen, dass Mantelzell-Lymphome, verglichen mit der ALL, empfindlicher auf die Behandlung ansprechen.

## 6.5 Kombinations-Therapie der Inhibitoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren Ibrutinib (BTK-Inhibitor), Idelalisib (PI3K-Inhibitor) und Temsirolimus (mTOR-Inhibitor) wurden auch miteinander kombiniert. Alle 3 greifen an unterschiedlichen Stellen in die Signalkaskade des BCR-Signalweges ein. Um die Wirksamkeit der Kombinationen Ibru/Cal (Ibrutinib, Idelalisib), Ibru/Tem (Ibrutinib, Temsirolimus) und Cal/Tem (Temsirolimus, Idelalisib) zu evaluieren wurden die MCL- und ALL-Zellen 72 Stunden lang behandelt und die Zellzahl mit der unbehandelten Kontrolle der jeweiligen Zelllinie verglichen. Beinahe alle MCL-Zelllinien (Mino, Granta 519, Z-138, JeKo-1, Rec-1) zeigten additive Effekte in den verwendeten Kombinationen. Bei Granta 519 wies Cal/Tem sogar eine synergistische Wirkung auf. Die einzige Ausnahme stellte die MCL-Zelllinie MAVER-1 dar. Die verwendeten Kombinationen führten alle zu antagonistischen Effekten. Die Effektivität von Ibru/Cal entsprach derjenigen der Idelalisib-Monotherapie, Ibru/Tem und Cal/Tem zeigten maximal die gleiche Zellzahlreduktion wie die Temsirolimus-Monotherapie.

Bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 ergaben sich nach Berechnung der Fraction of Product additive Effekte bei allen Kombinationen. Ibru/Tem und Cal/Tem waren zwar rechnerisch additiv, allerdings entsprach die Proliferationshemmung in beiden Fällen beinahe derjenigen der Temsirolimus-Monotherapie.

Wie bereits erwähnt führte keiner der eingesetzten Inhibitoren monotherapeutisch bei Rec-1 oder BALL-1 zu einer erhöhten Apoptoserate. Auch durch die Kombinations-Therapie von Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus konnte bei beiden Zelllinien,

verglichen mit der jeweils unbehandelten Kontrolle, keine Apoptose-Induktion beobachtet werden.

Bei Rec-1 ergab die Zellzyklus-Analyse ausgeprägte G1-Arreste. Die Ibrutinib-Monotherapie hatte den stärksten Effekt. Bei Idelalisib und Temsirolimus war die Steigerung des Zellanteils in der G1-Phase vergleichbar, aber viel geringer als bei Ibrutinib. Besonders die Ibrutinib-haltigen Kombinationen Ibru/Cal und Ibru/Tem zeigten fast vollständige G1-Arreste. Auch die Kombinations-Therapie Cal/Tem führte zu einem weitaus stärkeren G1-Arrest als die jeweiligen Monotherapien mit Idelalisib oder Temsirolimus. Die deutliche Steigerung dieses Effektes, verglichen mit der jeweiligen Monotherapie der Inhibitoren, verspricht eine sehr gute kombinatorische Wirkung zweier Inhibitoren des BCR-Signalweges in der Therapie des Mantelzell-Lymphoms. Eine Steigerung der anti-proliferativen und pro-apoptotischen Effekte durch Kombination von Idelalisib mit einem mTOR-Inhibitor (Everolimus) konnte von Meadows et al. [133] in vitro anhand der MCL-Zelllinien JeKo-1, Mino, Granta 519 und NCEB demonstriert werden. In dieser Arbeit ergab die Kombinations-Therapie von Temsirolimus und Idelalisib (Cal/Tem) ebenfalls bessere Ergebnisse als die jeweilige Monotherapie mit den genannten Inhibitoren.

Bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 waren die Zellzyklusänderungen insgesamt sehr viel geringer ausgeprägt. Ibrutinib und Idelalisib veränderten das Profil fast nicht. Auch ihre Kombination Ibru/Cal konnte keine Veränderung des Zellzyklusprofils herbeiführen. Temsirolimus führte zu einem leicht gesteigerten Anteil in der G1-Phase. Die Kombinations-Therapien Ibru/Tem und Cal/Tem erreichten, verglichen mit der Temsirolimus-Monotherapie, noch eine leichte Steigerung des G1-Phasen-Zellanteils. Die zusätzliche Gabe von Ibrutinib oder Idelalisib führte, verglichen mit der Temsirolimus-Monotherapie, also nur zu einer leichten Verstärkung des G1-Arrests. Es scheint also, dass die Wirkungen der Inhibitoren auf das Zellzyklusprofil als MCL-spezifisch bewertet werden können und eine doppelte Blockade des BCR-Signalweges beim Mantelzell-Lymphom zu einem gesteigerten therapeutischen Effekt führt.

Betrachtet man die Wirksamkeit der Inhibitoren im Vergleich, so fällt auf, dass der induzierte G1-Arrest durch Ibrutinib mit Abstand am deutlichsten ausgeprägt ist. Dies korreliert allerdings nicht direkt mit der Proliferationseinschränkung. Temsirolimus bewirkte bei allen Zelllinien die stärkste Wachstumshemmung, zeigte aber nicht so

starke Zellzyklusveränderungen wie Ibrutinib. Die kombinierte Gabe von Ibrutinib und Idelalisib (Ibru/Cal) führte bei keiner der MCL-Zelllinien zu einer stärkeren Proliferationseinschränkung als die jeweiligen Inhibitoren in Monotherapie. Allerdings wurde nach Kombination ein weitaus stärkerer G1-Arrest beobachtet, was annehmen lässt, dass höhere Dosierungen der Inhibitoren auch zu einer gesteigerten Proliferationseinschränkung in der Kombinations-Therapie führen könnten. Die beiden Temsirolimus-haltigen Kombinations-Therapien Ibru/Tem und Cal/Tem zeigten bei den in vitro Analysen der MCL-Zelllinien in beinahe allen Fällen eine Steigerung des zellreduktiven Effektes der jeweiligen Monotherapien. Dies gilt auch für die Zellzyklus-Analysen, denn der Arrest in der G1-Phase war in der Kombinations-Therapie gegenüber der jeweiligen Monotherapie deutlich gesteigert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die doppelte Blockade des BCR-Signalweges mit einem Kinasen-Inhibitor, der sehr weit upstream in die Signalkaskade eingreift (BTK-Inhibitor oder PI3K-Inhibitor), und einem mTOR-Inhibitor eine äußerst effektive neue Methode in der Therapie des Mantelzell-Lymphoms darstellen würde. Wie bereits erwähnt zeigten auch Meadows et al. [133] in ihrer Arbeit ähnlich gute Ergebnisse durch die gemeinsame Gabe von Idelalisib (PI3K-Inhibitor) und Everolimus (mTOR-Inhibitor).

## 6.6 Microenvironment – Feeder Layer

Interaktionen mit dem „Microenvironment“ des Tumors (TME – tumor microenvironment) spielen, zusätzlich zur vielschichtigen Pathogenese des MCL, eine entscheidende Rolle für das Überleben der Tumorzellen und deren Wachstum. [47] Das Microenvironment besteht u.a. aus Stromazellen, Macrophagen, NCL (Nurselike cells) und (regulatorischen) T-Zellen, welche durch zelluläre Strukturen und Signalstoffe (Chemokine, Chemokin-Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle, extrazelluläre Matrix) miteinander kommunizieren. [48-50] Die Abhängigkeit von MCL-Zellen von überlebensfördernden Faktoren konnte durch Co-Kultur mit Stromazellen in vitro bereits bestätigt werden. Die Tumorzellen waren vor den zytotoxischen Effekten der Chemotherapie geschützt und es zeigte sich ein verbessertes Zellüberleben. [59, 60]

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde für diese Arbeit erstmals ein Versuchsansatz entwickelt, in welchem die neoplastischen Zellen gleichzeitig mit Stromazellen (Feeder Layer) kultiviert wurden. So sollte gewährleistet werden, dass die

gewonnenen Ergebnisse der in vitro Analysen besser auf die in vivo Therapie von MCL-Patienten übertragbar sind. Wie unter 1.1.5 bereits beschrieben ist das Wachstum von B-Zell-Neoplasien TME-abhängig. Dies gilt auch für das Mantelzell-Lymphom und die akute lymphatische Leukämie. Das TME (Tumor Microenvironment) aktiviert die BCR-Signalkaskade und sichert somit das Überleben und die ungehinderte Proliferation der Tumorzellen. [48, 50] Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren greifen in die BCR-Signaltransduktion ein und die in der Co-Kultur verwendeten Stromazellen sollten die Effekte des TME imitieren.

Kurtova et al. [61] konnten anhand von in vitro Studien zeigen, dass MCL-Zellen (Mino, JeKo-1, Granta 519) mit murinen Stromazellen (M2-10B4) interagieren. Diese Zell-Zell-Interaktionen führten zu der Entwicklung einer Chemotherapie-Resistenz bei den Lymphomzellen. Diese war bei denjenigen MCL-Zellen, welche sich zwischen den Stromazellen ansiedelten, am stärksten ausgerägt. [61]

Bei Kultivierung der MCL- und ALL-Zellen auf Feeder Layer (Stromzell-Schicht) und nach Therapie mit den Inhibitoren, war somit einerseits eine Apoptose-induktion durch das Wegfallen der Überlebenssignale zu erwarten. Andererseits war eine geringere oder aufgehobene Chemotherapie-Resistenz zu erwarten, da die EMDR (environment-mediated drug resistance), welche durch Zell-Zell-Adhäsion von Lymphom- und Stromazellen entsteht, durch Hemmung der BCR-Signalkaskade unterbunden werden soll. Es wurden Experimente mit MCL-Zellen der Linie MAVER-1 und ALL-Zellen der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 auf Feeder Layer Zellen der murinen Fibroblasten-Zelllinie M2-10B4 durchgeführt. Die Ergebnisse konnten dann mit denen der in vitro Kombinations-Therapie ohne Feeder Layer verglichen werden. Es zeigte sich ein zum Teil besseres und zum Teil schlechteres Ansprechen auf die Chemotherapie nach der Kultivierung auf Feeder Layer. Burger et al. [55] beschreiben genauso wie Kurtova et al. [61] eine TME-induzierte Therapieresistenz. Diese Resistenz könnte durch einen adhäsions-bedingten Zellzyklusarrest verursacht werden, welcher bei MCL-Zellen in Co-Kultur mit Stromazellen von Lwin et al. [134] beobachtet werden konnte. Diese Chemotherapie-Resistenz sollte durch die Inhibitor-vermittelte Blockade der TME-Lymphom-Zell-Zell-Interaktion wieder aufzuheben sein. Ein solcher Effekt konnte anhand der Experimente in dieser Arbeit aber nicht bestätigt werden.

Das Ansprechen auf die Therapie mit Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus war auf Feeder Layer schlechter als in den Versuchen ohne Feeder Layer. Die Ursache

dieses Effektes ist allerdings unklar. Burger et al. [49] vermuten hingegen eine gute Wirksamkeit der genannten Inhibitoren bei B-Zell-Neoplasien wie der CLL und dem MCL, welche durch deren Potential die BCR-Signaltransduktion zu unterbrechen gewährleistet werden soll. Der BCR-Signalweg gilt als Schlüsselstelle der Kommunikation zwischen dem sogenannten Microenvironment (TME) und den B-Zellen. Ibrutinib und Idelalisib gelten als fortgeschrittene, spezifische Therapeutika, die bei B-Zell-Neoplasien durch Hemmung der Bruton's tyrosine kinase (BTK) oder Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) gezielt in die BCR-Signaltransduktion eingreifen und so die Kommunikation mit dem TME unterbrechen. [49]

### **6.6.1 Kombinations-Therapien ohne und mit Feeder Layer**

In der Monotherapie mit Ibrutinib auf Feeder Layer zeigte sich bei der MCL-Zelllinie MAVER-1 keinerlei Proliferationseinschränkung. Ohne Feeder Layer hatte hingegen eine Wachstumshemmung durch Ibrutinib stattgefunden. Warum nach Kultivierung auf Feeder Layer keine Wirksamkeit mehr zu beobachten war, bleibt unklar. Es konnte beobachtet werden, dass Cytarabin, Bendamustin und Cisplatin in Monotherapie eine stärkere Wirkung zeigten als bei den Versuchen ohne Feeder-Zellen. Dexamethason wirkte hingegen mit Feeder Layer etwas schlechter als ohne. Die schlechtere Wirksamkeit von Dexamethason bei den Versuchen auf Feeder Layer kann mit der Hypothese von Lwin et al. [134] vereinbart werden, welche besagt dass Stromazell-Kontakt bei Lymphomzellen zu einem reversiblen Wachstumsarrest führt. Perez-Galan et al. [6] vermuten, dass dieser Wachstumsarrest die Zellen vor zytotoxischer Therapie schützt, also zu einer Chemotherapie-Resistenz führt. Warum allerdings Cytarabin, Bendamustin und Cisplatin in Co-Kultur mit Feeder Layer-Zellen bessere Wirksamkeiten zeigten als in den Versuchen ohne Stromazellen, ist mit der eben genannten Hypothese nicht erklärbar.

In der Kombinations-Therapie auf Feeder Layer zeigte Ibru/A bessere und Ibru/D etwas schlechtere therapeutische Effekte. Die Kombinationen Ibru/B und Ibru/C führten zu ähnlichen Ergebnissen wie die Versuche ohne Feeder-Zellen. Da Ibrutinib hemmend in die BCR-Signalkaskade eingreift, war bei den Feeder Layer Versuchen eigentlich eine bessere Wirksamkeit der Zytostatika bei gemeinsamer Gabe mit einem solchen Inhibitor zu erwarten gewesen, da die EMDR durch Ibrutinib unterbunden sein sollte. Dies war aber nur in Kombination mit Cytarabin (Ibru/A) der Fall.

Bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 war die Wirksamkeit von Ibrutinib nach Kultivierung auf Feeder Layer leicht gesteigert. Auch Cytarabin erzielte eine höhere Wachstumseinschränkung. Bei Bendamustin und Dexamethason verschlechterte sich der therapeutische Effekt hingegen. Cisplatin zeigte ohne und mit Feeder Layer die gleiche Wirksamkeit. Nach Kombinations-Therapie mit Ibru/A war nach der Kultivierung der ALL-Zellen auf Feeder Layer eine stärkere Wachstumsreduktion zu beobachten. Ibru/B und Ibru/D zeigten eine deutlich geringere Wachstumshemmung als bei den Experimenten ohne Feeder Layer. Ibru/C hatte ohne und mit Feeder Layer beinahe den gleichen therapeutischen Effekt.

Es bleibt fraglich warum Ibrutinib bei der ALL-Linie BALL-1 mit Feeder Layer zu einem verbesserten therapeutischen Effekt führte und bei der MCL-Linie MAVER-1 der gegenteilige Effekt zu beobachten war.

Idelalisib bewirkte bei den Versuchen mit Feeder Layer sowohl bei MAVER-1 als auch bei BALL-1 keinerlei Proliferationseinschränkung, ohne Feeder Layer war hingegen eine Wachstumseinschränkung zu beobachten gewesen. Cytarabin und Cal/A wirkten auf Feeder Layer besser, die anderen Chemotherapeutika und Kombinations-Therapien zeigten bei MAVER-1 nur marginale Unterschiede zu den Versuchen ohne Feeder Layer. Bei BALL-1 waren die Monotherapien mit Bendamustin und Dexamethason sowie die Kombinations-Therapien Cal/B und Cal/D auf Feeder Layer weniger wirksam als ohne. Die Wirksamkeit von Cisplatin war unverändert, Cal/C zeigte nach Kultivierung der ALL-Zellen auf Feeder Layer keine Wirkung mehr.

Durch Temsirolimus konnte auch nach Kultivierung auf Feeder Layer die gleiche Proliferationseinschränkung bei MAVER-1 erreicht werden. Die Wirksamkeit aller eingesetzten Zytostatika verbesserte sich auf Feeder Layer leicht. Allerdings wären aufgrund der Erkenntnisse von Kurtova et al. [61] durch die Stromazell-vermittelte Therapie-Resistenz (EMDR – environment-mediated drug resistance) geringere Proliferationseinschränkungen zu erwarten gewesen. Bei allen Kombinationen der Zytostatika mit Temsirolimus war ebenfalls eine leicht verbesserte Wirksamkeit zu beobachten gewesen, als bei den Versuchen ohne Feeder Layer. Wenn man davon ausgeht, dass Temsirolimus als mTOR-Inhibitor in die BCR-Signaltransduktion

eingreift, wäre dieser verbesserte therapeutische Effekt im Sinne einer Aufhebung der EMDR durch Temsirolimus erklärbar.

Bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 war die Wirkung von Temsirolimus auf Feeder Layer hingegen schlechter. Bendamustin, Cisplatin und Dexamethason zeigten in Monotherapie ebenfalls entweder gleichbleibende oder schlechtere therapeutische Effekte auf Feeder Layer. Lediglich Cytarabin schränkte die Proliferation der ALL-Zellen mit Feeder Layer stärker ein als ohne. Die Kombinations-Therapie mit Temsirolimus zeigte im Fall von Tem/A gleichbleibende Effekte. Tem/B, Tem/C und Tem/D führten ohne Feeder Layer zu einer deutlich größeren Proliferationseinschränkung als mit Feeder Layer.

Die Kombinations-Therapie der Inhibitoren Ibrutinib und Idelalisib (Ibru/Cal) auf Feeder Layer ergab bei der MCL-Linie MAVER-1 keine eingeschränkte Proliferation. Ibrutinib und Idelalisib führten auch in der jeweiligen Monotherapie nicht zu einer Wachstumseinschränkung. Bei den Versuchen ohne Feeder Layer war nach Ibrutinib, Idelalisib und Ibru/Cal jedoch ein vermindertes Zellwachstum zu beobachten gewesen. Chang et al. [135] konnten durch in vitro Versuche mit MCL-Zellen zeigen, dass Ibrutinib in Co-Kultur eine Adhäsion der Lymphomzellen an Stromazellen unterbinden konnte. Shain et al. [50] beschreiben die Wirkung von Inhibitoren des BCR-Signalweges als „double-hit“-Strategie, da sowohl die BCR-Signaltransduktion, als auch die Blockade der BCR-vermittelten Zell-Zell-Interaktion unterbunden wird. Dies resultiert darin, dass sich die Lymphomzellen aus dem Gewebe (TME – tumor microenvironment) lösen und folglich wieder sensibel gegenüber chemotherapeutischen Therapieansätzen sind. [50]

Die Wirksamkeit von Temsirolimus, Ibru/Tem und Cal/Tem auf Feeder Layer unterschied sich hingegen nicht. Es wurde das gleiche Maß an Wachstumshemmung bewirkt wie in den Versuchen ohne Feeder Layer.

Bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 zeigte Ibrutinib bessere therapeutische Effekte auf Feeder Layer. Idelalisib bewirkte hingegen gar keine Proliferationseinschränkung mehr. Dies war bei den Versuchen ohne Feeder Layer noch der Fall gewesen. Die Kombination der beiden Inhibitoren (Ibru/Cal) führte auf Feeder Layer auch zu einer geringeren Wachstumshemmung als bei den Experimenten ohne Feeder-Zellen. Die Wirksamkeit von Temsirolimus, Ibru/Tem und Cal/Tem war auf Feeder Layer ebenfalls schlechter als ohne Feeder Layer.

Insgesamt lassen sich nur eingeschränkt Aussagen über die in vitro Therapie auf Feeder Layer treffen. Zum einen muss bedacht werden, dass die Menge an eingesetztem Medium bei den Experimenten ohne und mit Feeder Layer konstant war, genauso wie die verwendeten Dosierungen der Therapeutika. Auch die Konzentration der MCL- oder ALL-Zellen war konstant. Die Feeder Layer-Zellen waren nach der Bestrahlung zwar nicht mehr proliferationsfähig, aber dennoch stoffwechselaktiv. Man kann also davon ausgehen, dass nicht nur die Tumorzellen sondern auch die Stromazellen die Medikamente absorbiert und metabolisiert haben. Auch waren bei den Versuchen mit Feeder Layer mehr Zellen vorhanden, die Nährstoffe im Medium also auch schneller verbraucht, was eine verlangsamte Zellteilung der MCL- und ALL-Zellen bewirkt haben könnte.

Ein weiteres Problem stellten die Zellzahl- und Viabilitäts-Analysen mittels Vi-CELL dar. Die Feeder Layer-Zellen setzten sich zwar, wie gewünscht, adhärent am Boden der Kulturflaschen ab, die meisten Tumorzellen nisteten sich entlang der Stromazellen adhärent am Flaschenboden ein (siehe Abb. 3a und 3b unter 4.2.1). Für die Versuche wurden aus diesem Grund nur die Zellen der MCL-Linie MAVER-1 und die der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 verwendet, da diese beiden Zelllinien die geringste Tendenz zeigten sich ebenfalls am Flaschenboden anzusiedeln. Der Hauptanteil der Tumorzellen blieb somit in der Zellsuspension im Überstand. Da mittels Vi-CELL nur die Zellen im Medium-Überstand (also die in Zellsuspension befindlichen Zellen) analysiert werden konnten, entgingen die eingenisteten Tumorzellen der Analyse, die Zellkonzentration verfälscht. Andererseits könnten sich auch Stromazellen in der Zellsuspension befunden haben. Dies führte verfälschten Zellzählmessungen, da eigentlich nur die Tumorzellen ausgezählt werden sollten. Andererseits könnten apoptotische Stromazellen zu falsch niedrigen Zellviabilitätsmessungen geführt haben.

In diesem Zusammenhang muss bedacht werden, dass das gewünschte „Nursing“ der Lymphomzellen auf einer direkten Zell-Zell-Interaktion zwischen Stroma- und Tumorzellen beruht. Da nur die im Medium gelösten Tumorzellen analysiert werden konnten, ist unsicher, ob diese Zellen in gleichem Maße eine Aktivierung der BCR-Signalkaskade erfahren haben wie die eingenisteten Tumorzellen. Die für die Messungen verwendeten Zellen im Überstand könnten daher nicht repräsentativ sein, da die Interaktion mit dem Microenvironment (Feeder Layer) nicht sicher ist. In Zusammenschau all der genannten Faktoren lässt sich nicht genau abschätzen, wie

groß die Abweichungen in therapeutischer Effektivität, Zellviabilität, absoluter und relativer Zellzahl letztendlich ausfallen. Daher lassen sich die Ergebnisse der Kombinations-Versuche auf Feeder Layer nur mit den genannten Einschränkungen auswerten und mit den Ergebnissen mit der Kombinations-Therapie ohne Feeder Layer vergleichen.

Somit können die gemessenen Daten mit Vorsicht verwendet werden um Rückschlüsse auf die komplexen Mechanismen, die *in vivo* bei der Behandlung von Mantelzell-Lymphom-Patienten stattfinden, zu ziehen.

In der Arbeitsgruppe wurde daher in der Zwischenzeit die Methodik weiterentwickelt um die genannte Problematik zu umgehen. Es wurden Luciferase-transfizierte Feeder Layer-Zellen etabliert, die unter anderem für die Kombinations-Versuche verwendet werden können. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können somit eingenistete Tumorzellen von fluoreszierenden Stromazellen nach Trypsinierung unterschieden werden. Mit dem neu etablierten Versuchsaufbau ist es somit möglich die genannte Problematik der in dieser Arbeit durchgeföhrten Experimente zu vermeiden.

## 6.7 Fazit

In Zusammenschau aller gemessenen Daten konnten bei fast allen Zelllinien für jede Kombination eines der Zytostatika mit jeweils einem der Inhibitoren additive therapeutische Effekte gezeigt werden. Als besonders vielversprechend sind dabei die Kombinations-Therapien der eingesetzten Inhibitoren (Ibrutinib, Idelalisib, Temsirolimus) mit Cytarabin oder Dexamethason anzusehen. Dies legt die Überlegung nahe, ob sich die Effektivität des etablierten Therapie-Regimes R-DHAP (Rituximab, Dexamethason, Cytarabin, Cisplatin) durch die zusätzliche Gabe von Ibrutinib, Idelalisib oder Temsirolimus noch steigern lässt. In der STORM-Studie, einer prospektiven, multizentrischen Phase-I/II Studie, wird Temsirolimus zusätzlich zum R-DHAP-Schema für die Behandlung des therapierefraktären und rezidivierten DLBCL eingesetzt. [136] Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Daten lassen auf den erfolgreichen Einsatz einer solchen Kombinations-Therapie in der Behandlung des Mantelzell-Lymphoms hoffen.

Die Unterschiede der Wirkungseffektivität der Inhibitoren, aber auch der eingesetzten Kombinations-Therapien zwischen den MCL-Zelllinien verweisen auf die bekannte

Heterogenität dieser Erkrankung. Verschiedene Mutationen und Zellteilungsraten könnten für das unterschiedliche Therapie-Ansprechen verantwortlich sein. Da sich insgesamt bei der Vergleichs-Zelllinie BALL-1 in Mono- und Kombinations-Therapie ebenfalls gute Ergebnisse erzielen ließen, sind die eingesetzten Medikamente nicht als MCL-spezifisch anzusehen. Andere B-Zell-Neoplasien und im Fall von Temsirolimus auch andere Entitäten, zeigen sich ebenfalls therapie-sensibel. [128, 137-139] Die Wirksamkeit von Ibrutinib [84], Idelalisib [95, 97] und Temsirolimus [102, 103] in der MCL-Therapie wurde bereits durch einige klinische Studien untermauert. Natürlich müssten alle in vitro beobachteten Effekte in klinischen Studien reevaluiert werden, da die MCL-Therapie in vivo sehr komplexen Mechanismen unterworfen ist, aber die guten Daten der hier vorgestellten in vitro Analysen lassen auf den Erfolg der getesteten Kombinations-Therapien in klinischen Studien hoffen.

Es werden bereits klinische Studien durchgeführt, in denen die gemeinsame Wirksamkeit molekularer Inhibitoren mit konventioneller Chemotherapie und gezielter Immuntherapie (mit dem monoklonalen CD-20-Antikörper Rituximab) evaluiert wird. Momentan werden zum Beispiel die Ergebnisse der BERT-Studie, in welcher die kombinatorische Wirksamkeit von Bendamustin, Rituximab und Temsirolimus getestet wird, mit Spannung erwartet. In die Studie wurden 11 MCL-Patienten und 4 Patienten mit folliculärem Lymphom eingeschlossen, deren Erkrankung entweder therapierefraktär oder rezidiert war. Bisher berichten Hess et al. [140] von einer ORR von 93% (14/15 Patienten) und einer CR von 33% (5 Patienten, alle MCL). Diese Ergebnisse sprechen für die Nutzung des neuartigen BERT-Regimes bei MCL-Patienten im Rezidiv. [9, 140] Die in dieser Arbeit gemessenen in vitro Daten in der Kombinations-Therapie von Temsirolimus und Bendamustin wiesen bei allen Zelllinien (MCL und ALL) auf additive therapeutische Effekte hin. Das Zellwachstum konnte durch die gemeinsame Gabe der genannten Medikamente weiter reduziert werden.

Des Weiteren wurde bereits eine Phase-II Studie durchgeführt, in welcher der mTOR-Inhibitor Temsirolimus mit dem monoklonalen CD-20-Antikörper Rituximab kombiniert wurde. Hierbei ergab sich eine ORR von 59% (41 von 69 Patienten). [83] Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der BERT-Studie, so ist das BERT-Regime der alleinigen Gabe von Temsirolimus und Rituximab überlegen. Der Zusatz von Bendamustin konnte die ORR also maßgeblich steigern.

Die Kombination von Ibrutinib mit Rituximab oder mit Rituximab und Bendamustin ergab bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) sehr vielversprechende Ergebnisse. Ibrutinib und Rituximab führten bei den CLL-Patienten zu einer ORR von 85% und die Therapie mit Ibrutinib, Rituximab und Bendamustin ergab eine ORR von 92%. [51, 141-143] In dieser Arbeit bewirkte die Kombination von Ibrutinib und Bendamustin bei den meisten Zelllinien additive Effekte. Dies lässt hoffen, dass sich in der Therapie des Mantelzell-Lymphoms ähnlich gute Studienergebnisse erzielen lassen wie in der CLL-Therapie.

Ebenso wurde kürzlich eine klinische Phase-III Studien abgeschlossen, die die Wirksamkeit von Ibrutinib und Temsirolimus in Monotherapie miteinander vergleichen oder das etablierte BR-Schema (Bendamustin, Rituximab) ohne und mit der zusätzlichen Gabe von Ibrutinib in der Erstlinientherapie von MCL-Patienten bewerten. [9, 14, 91] In dieser Arbeit war die Ibrutinib-Monotherapie der Temsirolimus -Monotherapie in Wirksamkeit und Verträglichkeit weit überlegen. Weitere Experimente konnten zeigen, dass die gleichzeitige Gabe der beiden Inhibitoren zu sehr vielversprechenden Ergebnissen führte. Eine klinische Studie, die diesen Therapieansatz berücksichtigt, wäre daher äußerst interessant. Shain et al. [50] vermuten, dass eine Monotherapie mit einem BCR-Signalweg-Inhibitor *in vivo* durch die komplexen Interaktionen des TME mit den Lymphomzellen nicht ausreichen könnte. Sie schlagen daher vor sequentiell mit 2 gezielt auf den gleichen Signalpfad wirkenden Inhibitoren zu therapiieren. Meadows et al. [133] demonstrierten die gute Wirksamkeit der kombinierten Gabe von Idelalisib mit dem mTOR-Inhibitor Everolimus in einer *in vitro* Studie des Mantelzell-Lymphoms. Vergleichbare Daten konnten in dieser Arbeit durch die Kombination von Idelalisib und Temsirolimus generiert werden. Die zweifache Blockade des BCR-Signalweges war wirksamer als die jeweilige Monotherapie der genannten Inhibitoren. Dies als neuen Therapieansatz in der Behandlung des MCL zu etablieren scheint also vielversprechend zu sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen jedoch darauf hin, dass eine kombinierte Gabe von Ibrutinib und Idelalisib (Ibru/Cal) nicht sinnvoll zu sein scheint, da hier der therapeutische Effekt der jeweiligen Monotherapie durch die Kombination nicht weiter gesteigert werden konnte. Die Kombination von Ibrutinib und Temsirolimus (Ibru/Tem) und von Temsirolimus und Idelalisib (Cal/Tem) war hingegen in nahezu allen Fällen additiv. Die guten Ergebnisse der Temsirolimus-haltigen *in vitro* Kombinationen mehrerer Inhibitoren stellen einen

vielversprechenden Ansatz für neue klinische Studien dar. Der kombinierte Einsatz von Inhibitoren des BCR-Signalweges scheint ganz im Sinne von Shain et al. [50] zu einer noch effektiveren Unterbindung der Signaltransduktion zu führen und möglicherweise einer Resistenzbildung vorbeugen.

Nach Zusammenschau aller oben diskutierten Studien-Ergebnisse wird die MCL-Therapie in Zukunft höchstwahrscheinlich aus einer Kombination von Chemotherapie-Regimen, monoklonalen Antikörpern und molekular gezielten Inhibitoren bestehen.

Insgesamt waren alle Versuche gut reproduzierbar, die Wirksamkeiten der eingesetzten Medikamente und deren Kombinationen blieben konstant. Dies konnte durch die Errechnung der Standardabweichungen verdeutlicht werden. Die *in vitro* gemessenen Daten sind damit untereinander sehr gut vergleichbar.

Prinzipiell ist es aber nur bedingt möglich von *in vitro* gemessenen Daten und so gewonnenen Erkenntnissen direkt auf die *in vivo* Therapie des Mantelzell-Lymphoms zu schließen. Daher sollten die in der vorliegenden Arbeit identifizierten gut wirksamen Kombinations-Therapien in klinischen Studien geprüft werden, um zu zeigen ob sich die therapeutischen Effekte *in vivo* reproduzieren lassen.

Die in dieser Arbeit demonstrierte Wirksamkeit der Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus beim Mantelzell-Lymphom ist ein Hinweis auf die zentrale Rolle des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges im MCL. Somit könnten der BTK-Inhibitor Ibrutinib und der PI3K-Inhibitor Idelalisib auch bei anderen Entitäten wirksam sein, sofern der genannte Signalweg in aktiver Form vorliegt.

## 7 Zusammenfassung

Das Mantelzell-Lymphom ist ein reifes B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom, welches in der Lage ist lymphatisches Gewebe, das Knochenmark, das periphere Blut und auch extranodale Gewebe zu infiltrieren. Zwar handelt es sich, mit nur 5-10 % der NHL, um ein eher selenes Lymphom, allerdings hat es eine sehr schlechte Prognose und ist bis heute durch konventionelle Therapie nicht heilbar. Meist wird das MCL erst in bereits disseminiertem Stadium diagnostiziert und es kommt bei fast allen Patienten zu einem Rezidiv nach Ersttherapie. [6, 7, 9, 14]

Neue therapeutische Strategien, die in fehlregulierte Signalwege eingreifen, eröffnen Möglichkeiten einer spezifischen Therapie bei MCL-Patienten. [7] Daher sollte der Einsatz gezielt wirkender Therapeutika, wie zum Beispiel Ibrutinib, Idelalisib oder Temsirolimus bei Rezidivpatienten oder sogar in der Erstlinientherapie von MCL-Patienten berücksichtigt werden. Aktuell sind Ibrutinib, Temsirolimus, Lenalidomid und Bortezomib Therapeutika dieser Art, welche in Europa für die Behandlung von Rezidivpatienten zugelassen sind. Wobei Ibrutinib die höchste Ansprechrate bei MCL-Patienten aufweist. [5, 93]

In dieser Arbeit konnte die therapeutische Effektivität von Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus in Mono- und Kombinations-Therapie durch in vitro Analysen gezeigt werden. Es ergab sich durch zusätzliche Versuche mit der ALL-Zelllinie BALL-1, dass es sich hierbei nicht um MCL-spezifische therapeutische Effekte handelt. Es ist jedoch anzumerken, dass in den Zellzyklus-Analysen der MCL-Zellen sehr starke G1-Arreste durch die jeweilige Inhibitor-Therapie ausgelöst wurden. Die Zellzyklusveränderungen bei den ALL-Zellen waren hingegen insgesamt nur gering ausgeprägt.

Es konnte demonstriert werden, dass die Blockade des BCR-Signalweges durch Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus beim Mantelzell-Lymphom in vitro ein wirksamer Therapieansatz ist. Der mTOR-Inhibitor Temsirolimus zeigte sich monotherapeutisch in seiner Wirksamkeit den beiden anderen Inhibitoren Ibrutinib (BTK-Inhibitor) und Idelalisib (PI3K-Inhibitor) in vitro überlegen. Die Kombinations-Therapie der genannten Inhibitoren mit den verwendeten Zytostatika führte in beinahe allen Fällen zu additiven therapeutischen Effekten. Insgesamt waren hierbei die Cytarabin- und Dexamethason-haltigen Kombinationen mit den Inhibitoren am besten wirksam. Zudem zeigte sich auch die zweifache Hemmung des BCR-Signalweges durch

Ibrutinib oder Idelalisib in Kombination mit Temsirolimus als ein neuer, vielversprechender und effektiver Therapieansatz.

Eine Apoptose-Induktion konnte bei den MCL-Zellen nur durch Dexamethason-Monotherapie oder die Kombination von Dexamethason mit jeweils einem der Inhibitoren erreicht werden. Dies kann mit den niedrigen Standarddosierungen der Medikamente, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, zusammenhängen.

Die mit Feeder Layer durchgeführten Versuche lassen insgesamt noch keine schlüssigen Aussagen über die MCL-Therapie zu, da sich die Analysen auf die Zellen im Überstand beschränkten und die eingenisteten Zellen nicht einschlossen.

Zusammenfassend unterstreichen die hier dargestellten Ergebnisse, dass die Blockade des BCR-Signalweges durch unterschiedliche Inhibitoren einen effektiven Ansatz in der Mantelzell-Lymphom-Therapie darstellt. Diese Hemmstoffe erweitern das Repertoire der therapeutischen Optionen beim MCL und auch bei anderen B-Zell-Malignitäten und werden zu einem verbesserten Outcome bei Patienten beitragen. [55]

Es bleibt zu betonen, dass es sich beim MCL um eine sehr heterogene Entität handelt, was eine personalisierte Medizin, also eine individuelle Therapie von MCL-Patienten unumgänglich macht um das immer noch schlechte Outcome der Patienten verbessern zu können. [5, 6] Es sind weitere Untersuchungen nötig, um Resistenzmechanismen gegenüber gezielt wirkenden Inhibitoren aufzudecken, um diese dann vermeiden zu können. [50] Rahal et al. [126] gelang in dieser Richtung der Nachweis einiger Mutationen, welche beim Mantelzell-Lymphom zu einer Ibrutinib-Sensibilität oder -Resistenz führen können. Weitere Erkenntnisse in dieser Richtung sind notwendig um in Zukunft eine optimale, patientenzentrierte Behandlung des Mantelzell-Lymphoms möglich zu machen.

Des Weiteren muss eruiert werden, welche Chemotherapeutika sich am besten mit Hemmstoffen des BCR-Signalweges kombinieren lassen. In dieser Arbeit zeigten sich Bendamustin und Cisplatin als gute Kombinationspartner für Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus. Die gleichzeitige Gabe Cytarabin oder Dexamethason mit einem der genannten Inhibitoren erzielte sogar noch effektivere Ergebnisse, zumal sich die Dexamethason-haltigen Kombinationen als einzige als apoptose-induzierend erwiesen.

Zu guter Letzt gilt es außerdem den optimalen Zeitpunkt einer Therapie mit einem BCR-Signaltransduktions-Inhibitor zu definieren, das heißt ob der Einsatz in der Erstlinientherapie, in der Erhaltungstherapie oder in der Behandlung des therapierefraktären oder rezidivierten Mantelzell-Lymphoms am sinnvollsten ist. [50] Daher sind weitere in vitro Forschungen in enger Verknüpfung zur klinischen Anwendung auf diesem Gebiet notwendig.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Waibel, M., et al., *Rational combination therapies targeting survival signaling in aggressive B-cell leukemia/lymphoma*. Curr Opin Hematol, 2014. **21**(4): p. 297-308.
2. Morton, L.M., et al., *Rationale and Design of the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph) Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2014. **2014**(48): p. 1-14.
3. Harris, N.L., et al., *A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group*. Blood, 1994. **84**(5): p. 1361-92.
4. Jaffe, E.S., *The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 523-31.
5. Dreyling, M., et al., *Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2014. **25 Suppl 3**: p. iii83-92.
6. Perez-Galan, P., M. Dreyling, and A. Wiestner, *Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era*. Blood, 2011. **117**(1): p. 26-38.
7. Jares, P., D. Colomer, and E. Campo, *Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(10): p. 750-62.
8. Alinari, L., B. Christian, and R.A. Baiocchi, *Novel targeted therapies for mantle cell lymphoma*. Oncotarget, 2012. **3**(2): p. 203-11.
9. Zaja, F., et al., *Management of relapsed/refractory mantle cell lymphoma: a review of current therapeutic strategies*. Leuk Lymphoma, 2014. **55**(5): p. 988-98.
10. McKay, P., et al., *Guidelines for the investigation and management of mantle cell lymphoma*. Br J Haematol, 2012. **159**(4): p. 405-26.
11. Dreyling, M. and W. Hiddemann, *Current treatment standards and emerging strategies in mantle cell lymphoma*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 542-51.
12. Bosch, F., et al., *Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors*. Cancer, 1998. **82**(3): p. 567-75.
13. Maddocks, K. and K.A. Blum, *Treatment strategies in mantle cell lymphoma*. Cancer Treat Res, 2015. **165**: p. 251-70.
14. Dreyling, M. and N. European Mantle Cell Lymphoma, *Mantle cell lymphoma: biology, clinical presentation, and therapeutic approaches*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2014: p. 191-8.
15. Hoster, E., et al., *A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma*. Blood, 2008. **111**(2): p. 558-65.
16. Banks, P.M., et al., *Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data*. Am J Surg Pathol, 1992. **16**(7): p. 637-40.

17. Campo, E., M. Raffeld, and E.S. Jaffe, *Mantle-cell lymphoma*. Semin Hematol, 1999. **36**(2): p. 115-27.
18. Raffeld, M. and E.S. Jaffe, *bcl-1, t(11;14), and mantle cell-derived lymphomas*. Blood, 1991. **78**(2): p. 259-63.
19. Raty, R., et al., *Ki-67 expression level, histological subtype, and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma*. Eur J Haematol, 2002. **69**(1): p. 11-20.
20. Bosch, F., et al., *PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma*. Blood, 1994. **84**(8): p. 2726-32.
21. Yatabe, Y., et al., *Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma*. Blood, 2000. **95**(7): p. 2253-61.
22. Jares, P., D. Colomer, and E. Campo, *Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma*. J Clin Invest, 2012. **122**(10): p. 3416-23.
23. Welzel, N., 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): p. 1629-36.
24. Chiarle, R., et al., *Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma*. Blood, 2000. **95**(2): p. 619-26.
25. Qi, C.F., et al., *Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and its deregulation in mouse B cell lymphomas*. Leuk Res, 2006. **30**(2): p. 153-63.
26. Marzec, M., et al., *Mantle cell lymphoma cells express predominantly cyclin D1a isoform and are highly sensitive to selective inhibition of CDK4 kinase activity*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1744-50.
27. Wiestner, A., et al., *Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4599-606.
28. Chen, R.W., et al., *Truncation in CCND1 mRNA alters miR-16-1 regulation in mantle cell lymphoma*. Blood, 2008. **112**(3): p. 822-9.
29. Deshpande, A., et al., *3'UTR mediated regulation of the cyclin D1 proto-oncogene*. Cell Cycle, 2009. **8**(21): p. 3592-600.
30. Fu, K., et al., *Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4315-21.
31. Mozos, A., et al., *SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype*. Haematologica, 2009. **94**(11): p. 1555-62.
32. Ek, S., et al., *Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma*. Blood, 2008. **111**(2): p. 800-5.

33. Gesk, S., 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): p. 1109-10.
34. Salaverria, I., et al., *CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma*. Blood, 2013. **121**(8): p. 1394-402.
35. Jares, P. and E. Campo, *Advances in the understanding of mantle cell lymphoma*. Br J Haematol, 2008. **142**(2): p. 149-65.
36. Engelman, J.A., *Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 550-62.
37. Rizzatti, E.G., 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): p. 516-26.
38. Peponi, E., 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): p. 2171-80.
39. Dal Col, J., et al., *Distinct functional significance of Akt and mTOR constitutive activation in mantle cell lymphoma*. Blood, 2008. **111**(10): p. 5142-51.
40. Rudelius, M., et al., *Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1668-76.
41. Hofmann, W.K., et al., *Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray*. Blood, 2001. **98**(3): p. 787-94.
42. Pighi, C., et al., *Phospho-proteomic analysis of mantle cell lymphoma cells suggests a pro-survival role of B-cell receptor signaling*. Cell Oncol (Dordr), 2011. **34**(2): p. 141-53.
43. Rinaldi, A., et al., *Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma*. Br J Haematol, 2006. **132**(3): p. 303-16.
44. Psyrri, A., et al., *Phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha gene amplification contributes to the pathogenesis of mantle cell lymphoma*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(18): p. 5724-32.
45. Chang, F., et al., *Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy*. Leukemia, 2003. **17**(3): p. 590-603.
46. Song, G., G. Ouyang, and S. Bao, *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(1): p. 59-71.
47. Drach, J., S. Seidl, and H. Kaufmann, *Treatment of mantle cell lymphoma: targeting the microenvironment*. Expert Rev Anticancer Ther, 2005. **5**(3): p. 477-85.
48. Coupland, S.E., *The challenge of the microenvironment in B-cell lymphomas*. Histopathology, 2011. **58**(1): p. 69-80.

49. Burger, J.A. and J.G. Gribben, *The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies*. Semin Cancer Biol, 2014. **24**: p. 71-81.
50. Shain, K.H. and J. Tao, *The B-cell receptor orchestrates environment-mediated lymphoma survival and drug resistance in B-cell malignancies*. Oncogene, 2014. **33**(32): p. 4107-13.
51. Buchner, M. and M. Muschen, *Targeting the B-cell receptor signaling pathway in B lymphoid malignancies*. Curr Opin Hematol, 2014. **21**(4): p. 341-9.
52. Kraus, M., et al., *Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer*. Cell, 2004. **117**(6): p. 787-800.
53. Lam, K.P., R. Kuhn, and K. Rajewsky, *In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death*. Cell, 1997. **90**(6): p. 1073-83.
54. Küppers, R., *Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis*. Nature Reviews Cancer, 2005. **5**(4): p. 251-262.
55. Burger, J.A. and R.J. Ford, *The microenvironment in mantle cell lymphoma: cellular and molecular pathways and emerging targeted therapies*. Semin Cancer Biol, 2011. **21**(5): p. 308-12.
56. Medina, D.J., et al., *Mesenchymal stromal cells protect mantle cell lymphoma cells from spontaneous and drug-induced apoptosis through secretion of B-cell activating factor and activation of the canonical and non-canonical nuclear factor kappaB pathways*. Haematologica, 2012. **97**(8): p. 1255-63.
57. Scott, D.W. and R.D. Gascoyne, *The tumour microenvironment in B cell lymphomas*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(8): p. 517-34.
58. Lwin, T., et al., *Lymphoma cell adhesion-induced expression of B cell-activating factor of the TNF family in bone marrow stromal cells protects non-Hodgkin's B lymphoma cells from apoptosis*. Leukemia, 2009. **23**(1): p. 170-7.
59. Saba, N. and A. Wiestner, *Do mantle cell lymphomas have an 'Achilles heel'?* Curr Opin Hematol, 2014. **21**(4): p. 350-7.
60. Xargay-Torrent, S., et al., *Sorafenib inhibits cell migration and stroma-mediated bortezomib resistance by interfering B-cell receptor signaling and protein translation in mantle cell lymphoma*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(3): p. 586-97.
61. Kurtova, A.V., et al., *Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting*. Blood, 2009. **113**(19): p. 4604-13.
62. Damiano, J.S., et al., *Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1658-67.
63. Schweighoffer, E., et al., *The BAFF receptor transduces survival signals by co-opting the B cell receptor signaling pathway*. Immunity, 2013. **38**(3): p. 475-88.
64. Koschmieder, S., et al., *Murine M2-10B4 and SL/SL cell lines differentially affect the balance between CD34+ cell expansion and maturation*. Int J Hematol, 2001. **73**(1): p. 71-7.

65. Aiuti, A., et al., *Identification of distinct elements of the stromal microenvironment that control human hematopoietic stem/progenitor cell growth and differentiation*. Exp Hematol, 1998. **26**(2): p. 143-57.
66. Dexter, T.M. and E. Spooncer, *Growth and differentiation in the hemopoietic system*. Annu Rev Cell Biol, 1987. **3**: p. 423-41.
67. Edelmann, J., et al., *Bone marrow fibroblasts induce expression of PI3K/NF-kappaB pathway genes and a pro-angiogenic phenotype in CLL cells*. Leuk Res, 2008. **32**(10): p. 1565-72.
68. Smith, M.R., *Should there be a standard therapy for mantle cell lymphoma?* Future Oncol, 2011. **7**(2): p. 227-37.
69. Geisler, C.H., 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): p. 2687-93.
70. Hermine, O., et al., *Addition of high-dose cytarabine to immunochemotherapy before autologous stem-cell transplantation in patients aged 65 years or younger with mantle cell lymphoma (MCL Younger): a randomised, open-label, phase 3 trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network*. The Lancet, 2016. **388**(10044): p. 565-575.
71. Lenz, G., et al., *Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG)*. J Clin Oncol, 2005. **23**(9): p. 1984-92.
72. Rummel, M.J., 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*. Lancet, 2013. **381**(9873): p. 1203-10.
73. Kluin-Nelemans, H.C., et al., *Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma*. N Engl J Med, 2012. **367**(6): p. 520-31.
74. Visco, C., et al., *Combination of rituximab, bendamustine, and cytarabine for patients with mantle-cell non-Hodgkin lymphoma ineligible for intensive regimens or autologous transplantation*. J Clin Oncol, 2013. **31**(11): p. 1442-9.
75. Rosenbluth, B.D. and J. Yahalom, *Highly effective local control and palliation of mantle cell lymphoma with involved-field radiation therapy (IFRT)*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006. **65**(4): p. 1185-91.
76. Robinson, S., et al., *The EBMT/EMCL consensus project on the role of autologous and allogeneic stem cell transplantation in mantle cell lymphoma*. Leukemia, 2015. **29**(2): p. 464-73.
77. Weigert, O., et al., *A novel regimen combining high dose cytarabine and bortezomib has activity in multiply relapsed and refractory mantle cell lymphoma - long-term results of a multicenter observation study*. Leuk Lymphoma, 2009. **50**(5): p. 716-22.
78. Zinzani, P.L., et al., *Long-term follow-up of lenalidomide in relapsed/refractory mantle cell lymphoma: subset analysis of the NHL-003 study*. Ann Oncol, 2013. **24**(11): p. 2892-7.

79. Goy, A., et al., *Single-agent lenalidomide in patients with mantle-cell lymphoma who relapsed or progressed after or were refractory to bortezomib: phase II MCL-001 (EMERGE) study*. J Clin Oncol, 2013. **31**(29): p. 3688-95.
80. Goy, A., et al., *Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study*. Ann Oncol, 2009. **20**(3): p. 520-5.
81. Wang, M., et al., *Lenalidomide in combination with rituximab for patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: a phase 1/2 clinical trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(7): p. 716-23.
82. Hess, G., et al., *Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(23): p. 3822-9.
83. Ansell, S.M., et al., *Tensirolimus and rituximab in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: a phase 2 study*. Lancet Oncol, 2011. **12**(4): p. 361-8.
84. Wang, M.L., et al., *Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma*. N Engl J Med, 2013. **369**(6): p. 507-16.
85. Trněný, M., et al., *Lenalidomide versus investigator's choice in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (MCL-002; SPRINT): a phase 2, randomised, multicentre trial*. The Lancet Oncology, 2016. **17**(3): p. 319-331.
86. Hess, G., et al., *Tensirolimus in combination with bendamustine and rituximab for the treatment of relapsed mantle cell and follicular lymphoma: report on an ongoing phase I/II trial*. Blood, 2011. **118**(21): p. 2697-2697.
87. Honigberg, L.A., 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*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(29): p. 13075-80.
88. Cinar, M., et al., *Bruton tyrosine kinase is commonly overexpressed in mantle cell lymphoma and its attenuation by Ibrutinib induces apoptosis*. Leuk Res, 2013. **37**(10): p. 1271-7.
89. Herman, S.E., et al., *Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765*. Blood, 2011. **117**(23): p. 6287-96.
90. Davis, R.E., et al., *Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma*. Nature, 2010. **463**(7277): p. 88-92.
91. Dreyling, 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): p. 770-778.
92. Goldenberg, M.M., *Pharmaceutical approval update*. Pt, 2014. **39**(4): p. 262-96.
93. von Ibrutinib, S.Ü., *Ibrutinib erhält Zulassung für den Einsatz als Einzelsubstanz zur Therapie der CLL und des MCL*. Transfus Med Hemother, 2014. **41**(6): p. 14.

94. Lannutti, B.J., et al., *CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability*. Blood, 2011. **117**(2): p. 591-4.
95. Kahl, B.S., et al., *A phase 1 study of the PI3Kdelta inhibitor idelalisib in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma (MCL)*. Blood, 2014. **123**(22): p. 3398-405.
96. Herman, S.E., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals*. Blood, 2010. **116**(12): p. 2078-88.
97. Kahl, B.S., N.H. Fowler, and M.S. Czuczman, *Integrating emerging treatment options in mantle cell lymphoma*. Clin Adv Hematol Oncol, 2013. **11**(12 Suppl 19): p. 1-15.
98. Markham, A., *Idelalisib: first global approval*. Drugs, 2014. **74**(14): p. 1701-7.
99. Gohil, K., *Pharmaceutical approval update*. Pt, 2014. **39**(10): p. 684-94.
100. Miller, B.W., et al., *FDA Approval: Idelalisib Monotherapy for the Treatment of Patients with Follicular Lymphoma and Small Lymphocytic Lymphoma*. Clin Cancer Res, 2015.
101. Dancey, J., *mTOR signaling and drug development in cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(4): p. 209-19.
102. Witzig, T.E., et al., *Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(23): p. 5347-56.
103. Ansell, S.M., et al., *Low-dose, single-agent temsirolimus for relapsed mantle cell lymphoma: a phase 2 trial in the North Central Cancer Treatment Group*. Cancer, 2008. **113**(3): p. 508-14.
104. Bertoni, F., et al., *Update on the molecular biology of mantle cell lymphoma*. Hematol Oncol, 2006. **24**(1): p. 22-7.
105. Herrmann, A., et al., *Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(4): p. 511-8.
106. Salvaris, E., et al., *Characterization of two novel pre-B-cell lines (LK63 and LiLa-1): potential models of pre-B-cell differentiation*. Leuk Res, 1992. **16**(6-7): p. 655-63.
107. Rudolph, C., et al., *Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519*. Cancer Genet Cytogenet, 2004. **153**(2): p. 144-50.
108. Jeon, H.J., et al., *Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line*. Br J Haematol, 1998. **102**(5): p. 1323-6.
109. Zamo, A., et al., *Establishment of the MAVER-1 cell line, a model for leukemic and aggressive mantle cell lymphoma*. Haematologica, 2006. **91**(1): p. 40-7.
110. Amin, H.M., et al., *Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines*. Arch Pathol Lab Med, 2003. **127**(4): p. 424-31.
111. Camps, J., et al., *Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines*. Leuk Res, 2006. **30**(8): p. 923-34.

112. Estrov, Z., 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): p. 341-53.
113. Medeiros, L.J., Z. Estrov, and G.Z. Rassidakis, *Z-138 cell line was derived from a patient with blastoid variant mantle cell lymphoma*. Leuk Res, 2006. **30**(4): p. 497-501.
114. Burger, J.A., et al., *Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2655-63.
115. Lemoine, F.M., et al., *Transformation-associated alterations in interactions between pre-B cells and fibronectin*. Blood, 1990. **76**(11): p. 2311-20.
116. Lemoine, F.M., et al., *Partial characterization of a novel stromal cell-derived pre-B-cell growth factor active on normal and immortalized pre-B cells*. Exp Hematol, 1988. **16**(8): p. 718-26.
117. Lemoine, F.M., et al., *Autocrine production of pre-B-cell stimulating activity by a variety of transformed murine pre-B-cell lines*. Cancer Res, 1988. **48**(22): p. 6438-43.
118. Sutherland, H.J., et al., *Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells*. Blood, 1991. **78**(3): p. 666-72.
119. Hogge, D.E., et al., *Enhanced detection, maintenance, and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human steel factor, interleukin-3, and granulocyte colony-stimulating factor*. Blood, 1996. **88**(10): p. 3765-73.
120. Ponchio, L., et al., *Mitomycin C as an alternative to irradiation to inhibit the feeder layer growth in long-term culture assays*. Cytotherapy, 2000. **2**(4): p. 281-6.
121. Webb, J., *Effect of more than one inhibitor*. Enzyme and metabolic inhibitors, 1963. **1**: p. 66-79.
122. Castedo, M., et al., *Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis*. J Immunol, 1996. **157**(2): p. 512-21.
123. Goldenberg, M.M., *Pharmaceutical approval update*. Pt, 2014. **39**(1): p. 37-9.
124. Cameron, F. and M. Sanford, *Ibrutinib: first global approval*. Drugs, 2014. **74**(2): p. 263-71.
125. *Ibrutinib approved for mantle cell lymphoma*. Cancer Discov, 2014. **4**(1): p. Of1.
126. Rahal, R., et al., *Pharmacological and genomic profiling identifies NF-kappaB-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma*. Nat Med, 2014. **20**(1): p. 87-92.
127. Visco, C., et al., *The cytotoxic effects of bendamustine in combination with cytarabine in mantle cell lymphoma cell lines*. Blood Cells Mol Dis, 2012. **48**(1): p. 68-75.
128. Hudes, G., et al., *Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma*. New England Journal of Medicine, 2007. **356**(22): p. 2271-2281.
129. Younes, A., *Therapeutic activity of mTOR inhibitors in mantle cell lymphoma: clues but no clear answers*. Autophagy, 2008. **4**(5): p. 707-9.

130. Yazbeck, V.Y., et al., *Temsirolimus downregulates p21 without altering cyclin D1 expression and induces autophagy and synergizes with vorinostat in mantle cell lymphoma*. Exp Hematol, 2008. **36**(4): p. 443-50.
131. Haritunians, T., et al., *Antiproliferative activity of RAD001 (everolimus) as a single agent and combined with other agents in mantle cell lymphoma*. Leukemia, 2007. **21**(2): p. 333-9.
132. Hipp, S., et al., *Inhibition of the mammalian target of rapamycin and the induction of cell cycle arrest in mantle cell lymphoma cells*. Haematologica, 2005. **90**(10): p. 1433-4.
133. Meadows, S.A., et al., *CAL-101 (GS-1101), a Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol-3-Kinase-Delta (PI3K{delta}), Disrupts Signals From the Microenvironment, Induces Apoptosis, and Enhances the Antitumor Activity of Everolimus (RAD001), An Inhibitor of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), in Mantle Cell Lymphoma (MCL)*. ASH Annual Meeting Abstracts, 2011. **118**(21): p. 3730-.
134. Lwin, T., et al., *Cell adhesion induces p27kip1-associated cell-cycle arrest through down-regulation of the SCFSkp2 ubiquitin ligase pathway in mantle-cell and other non-Hodgkin B-cell lymphomas*. Blood, 2007. **110**(5): p. 1631-8.
135. Chang, B.Y., et al., *Egress of CD19(+)CD5(+) cells into peripheral blood following treatment with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in mantle cell lymphoma patients*. Blood, 2013. **122**(14): p. 2412-24.
136. Witzens-Harig, M., et al., *A phase I/II trial to evaluate the safety, feasibility and activity of salvage therapy consisting of the mTOR inhibitor Temsirolimus added to standard therapy of Rituximab and DHAP for the treatment of patients with relapsed or refractory diffuse large cell B-Cell lymphoma—the STORM trial*. BMC cancer, 2013. **13**(1): p. 1.
137. Aalipour, A. and R.H. Advani, *Bruton tyrosine kinase inhibitors: a promising novel targeted treatment for B cell lymphomas*. Br J Haematol, 2013. **163**(4): p. 436-43.
138. Curran, E. and S.M. Smith, *Phosphoinositide 3-kinase inhibitors in lymphoma*. Curr Opin Oncol, 2014. **26**(5): p. 469-75.
139. Samad, N. and A. Younes, *Temsirolimus in the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma*. Onco Targets Ther, 2010. **3**: p. 167-78.
140. Hess, G., et al., *Safety and efficacy of temsirolimus in combination with bendamustine and rituximab in relapsed mantle cell and follicular lymphoma*. Leukemia, 2015. **29**(8): p. 1695-1701.
141. Burger, J.A., et al. *The Btk inhibitor ibrutinib (PCI-32765) in combination with rituximab is well tolerated and displays profound activity in high-risk chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients*. in ASH annual meeting abstracts. 2012.
142. Byrd, J.C., et al., *Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia*. New England Journal of Medicine, 2013. **369**(1): p. 32-42.
143. O'Brien, S.M., et al., *Combination of the Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor PCI-32765 with bendamustine (B)/rituximab (R) (BR) in patients (pts) with relapsed/refractory (R/R) chronic lymphocytic leukemia (CLL): Interim results of a phase Ib/II study*. J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 2012. **30**(15\_suppl): p. 6515.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Der B-Zell-Rezeptor-Signalweg .....	17
Abbildung 2a/b:	Adhäsente Feeder Layer Zellen .....	32
Abbildung 3a/b:	BALL-1 auf adhärenten Feeder Layer Zellen.....	33
Abbildung 4a/b:	Dot Plots Apoptose FACS.....	37
Abbildung 5a/b:	Zellzyklus FACS .....	39
Abbildung 6:	Dosisfindung für Ibrutinib bei allen Zelllinien.....	40
Abbildung 7:	Wachstumskurven bei Therapie mit 10 nM Ibrutinib.....	42
Abbildung 8a:	Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei Rec-1.....	43
Abbildung 8b:	Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei BALL-1 .....	44
Abbildung 9a/b:	Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei MAVER-1 ohne und mit Feeder Layer .....	46
Abbildung 9c:	Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei BALL-1 auf Feeder Layer .....	48
Abbildung 10a:	Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei Rec-1 .....	51
Abbildung 10b:	Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei BALL-1 .....	52
Abbildung 11:	Wachstumskurven bei Therapie mit 5 $\mu$ M Idelalisib .....	53
Abbildung 12a:	Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei Rec-1.....	54
Abbildung 12b:	Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei BALL-1 .....	55
Abbildung 13a/b:	Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei MAVER-1 ohne und mit Feeder Layer .....	57
Abbildung 13c:	Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei BALL-1 auf Feeder Layer.....	59
Abbildung 14a:	Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei Rec-1 .....	62
Abbildung 14b:	Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei BALL-1 .....	63
Abbildung 15:	Wachstumskurven bei Therapie mit 10 nM Temsirolimus .....	64
Abbildung 16a:	Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei Rec-1 .....	66
Abbildung 16b:	Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei BALL-1 .....	67
Abbildung 17a/b:	Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei MAVER-1 ohne und mit Feeder Layer .....	69
Abbildung 17c:	Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei BALL-1 auf Feeder Layer .....	70
Abbildung 18a:	Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei Rec-1 .....	73
Abbildung 18b:	Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei BALL-1 .....	74
Abbildung 19a:	Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei Rec-1 .....	75
Abbildung 19b:	Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei BALL-1 .....	76
Abbildung 20a/b:	Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei MAVER-1 ohne und mit Feeder Layer .....	78
Abbildung 20c:	Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei BALL-1 auf Feeder Layer .....	79
Abbildung 21a:	Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei Rec-1 .....	81
Abbildung 21b:	Zellzyklusprofil nach Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei BALL-1 .....	82

Abbildung 8c:	Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei Granta 519 .....	119
Abbildung 8d/e:	Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei JeKo-1 und Mino .....	120
Abbildung 8f:	Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei Z-138 .....	121
Abbildung 12c:	Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei Granta 519 .....	121
Abbildung 12d/e:	Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei JeKo-1 und Mino.....	122
Abbildung 12f:	Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei Z-138.....	123
Abbildung 16c:	Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei Granta 519.....	123
Abbildung 16d/e:	Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei JeKo-1 und Mino .....	124
Abbildung 16f:	Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei Z-138 .....	125
Abbildung 19c:	Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei Granta 519 .....	125
Abbildung 19d/e:	Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei JeKo-1 und Mino.....	126
Abbildung 19f:	Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei Z-138.....	127

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Reagenzien, Lösungen und Puffer .....	27
Tabelle 2:	Verwendete Inhibitoren, deren Hersteller und deren Dosierung .....	28
Tabelle 3:	Verwendete Zytostatika, deren Hersteller und deren Dosierung.....	28
Tabelle 4:	Verwendete MCL- und ALL-Zelllinien .....	30
Tabelle 5:	Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib .....	45
Tabelle 6:	Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib ohne und mit Feeder Layer.....	48
Tabelle 7:	Apoptose-FACS Daten nach 48 Stunden bei Rec-1 .....	50
Tabelle 8:	Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Idelalisib .....	56
Tabelle 9:	Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Idelalisib ohne und mit Feeder Layer.....	60
Tabelle 10:	Apoptose-FACS Daten nach 48 Stunden bei Rec-1 .....	61
Tabelle 11:	Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Temsirolimus.....	67
Tabelle 12:	Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Temsirolimus ohne und mit Feeder Layer.....	71
Tabelle 13:	Apoptose-FACS Daten nach 48 Stunden bei Rec-1 .....	72
Tabelle 14:	Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus.....	77
Tabelle 15:	Fraction of Product nach Kombinations-Therapie mit Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus ohne und mit Feeder Layer .....	80

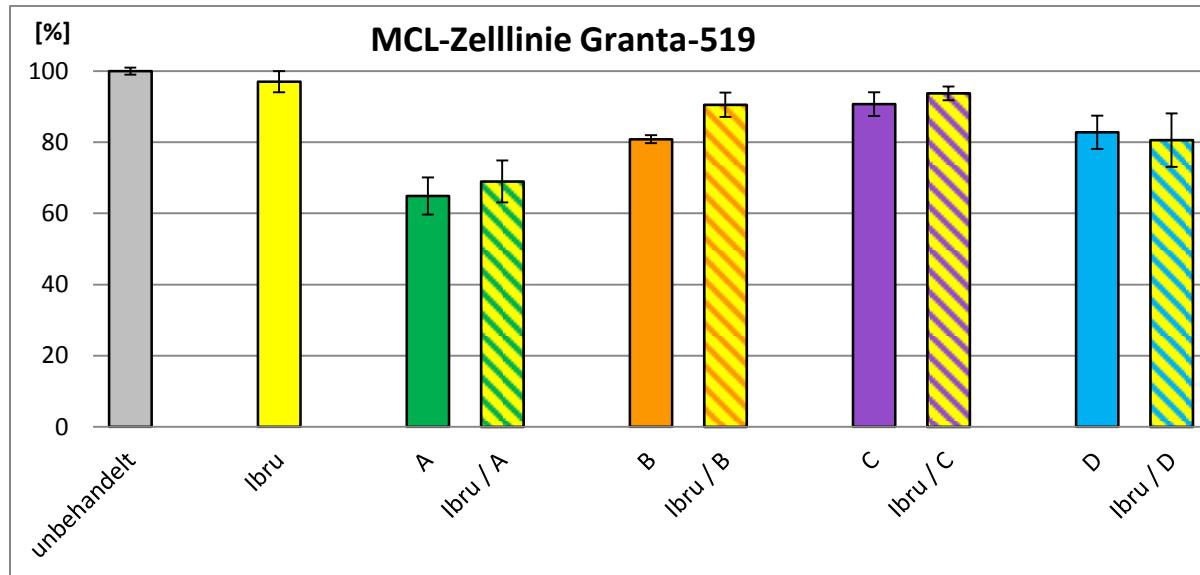
## 11 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µM	mikromolar
A	AraC (Cytarabin)
Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B (PI3K/AKT/mTOR-Signalweg)
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AraC	Cytarabin
ASCT	allogene Stammzelltransplantation
ATM	Serin/Threonin Kinase (Ataxia telangiectasia mutated)
B	Bendamustin
BCAP	B-Zell PI3K-Adapter Protein
BCR	B-Zell-Rezeptor (b-cell receptor)
B-NHL	B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom
BR	Bendamustin, Rituximab
B-SLL	Unterform der CLL (b-cell small lymphocytic lymphoma)
BTK	Bruton-Tyrosinkinase (Bruton's tyrosine kinase)
C	Cisplatin
Cal	Cal-101 / Idelalisib / GS-1101
CAM-DR	cell adhesion-mediated drug resistance
CCND1	Proto-Onkogen, kodiert für Cyclin D1
CCND2	Gen, kodiert für Cyclin D2
CD	Oberflächenmarker von Zellen (Cluster of Differentiation)
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
CHK	Checkpoint Kinase
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
cells/cm <sup>2</sup>	Zellen pro Quadratzentimeter
cells/ml	Zellen pro Milliliter
CR	vollständige Remission (Complete Remission)
CT	Computertomographie
D	Dexamethason
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (Diffuse large B-cell lymphoma)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2F	Transkriptionsfaktor
ECM	extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EMA	European Medicines Agency
EMDR	environment-mediated drug resistance
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorter)
FBS	fetales Kälberserum (fetal bovine serum)
FDA	behördliche Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten (Food and Drug Administration)
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)
Gy	Gray
HIV	Humanes Immundefizienz Virus (Human immunodeficiency virus)
Ibru	Ibrutinib / PCI 32675
Ig	Immunglobulin
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MCL	Mantelzell-Lymphom (mantle cell lymphoma)

min	Minuten
MIPI	Mantle cell lymphoma International Prognostic Index
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NLC	nurselike cells
NF-κB	Transkriptionsfaktor (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)
ng	Nanogramm
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
nM	nanomolar
ORR	Gesamtansprechrate (overall response rate)
OS	Gesamtüberleben (Overall Survival)
PDK1	Phosphoinositid abhängige Kinase 1 (phosphoinositide-dependent kinase 1)
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie
PFS	progressionsfreies Überleben (progression free survival)
PI	Propidiumiodid (Propidium Iodide)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC-β	Proteinkinase C-β
PLC-γ	Phospholipase C-γ
PTEN	Phosphatase and Tensin homologue
R	Rituximab
RB1	Retinoblastom-Protein 1
R-BAC	Rituximab, Bendamustin, Cytarabin
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
R-DHAP	Rituximab, Dexamethason, Cytarabin, Cisplatin
REAL	REAL-Klassifikation (Revised European-American Lymphoma Classification)
RT	Raumtemperatur
SCT	Stammzelltransplantation (stem cell transplantation)
SYK	Tyrosinkinase (spleen tyrosine kinase)
TBI	Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation)
Tem	Temsirolimus
TME	tumor microenvironment
TP53	Tumor-Suppressor-Gen 53, kodiert für Protein p53
TTF	mittlere Zeit bis zum Therapieversagen (time to treatment failure)
UTR	untranslatierter Bereich (untranslated region)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 12 Anhang

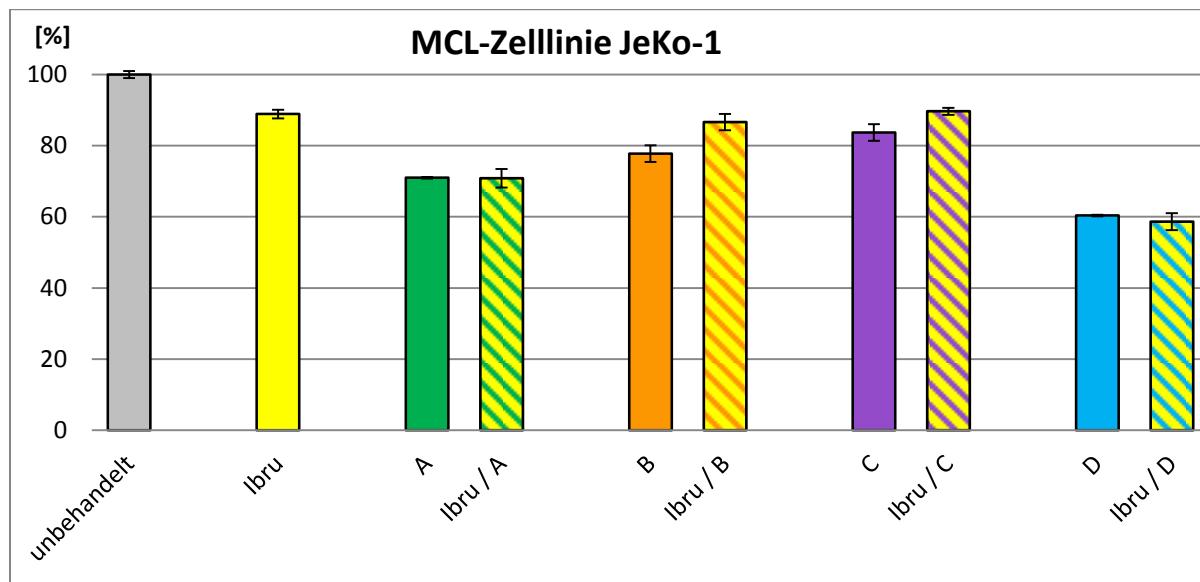
Die Kombinations-Versuche ohne Feeder Layer wurden bei allen Zelllinien (MCL: Granta 519, JeKo-1, MAVER-1, Mino, Rec-1, Z-138; ALL: BALL-1) durchgeführt. Im Text finden sich die Graphiken der ALL-Zelllinie BALL-1 und der MCL-Zelllinien Rec-1 und MAVER-1. Die restlichen Abbildungen der gemessenen Ergebnisse werden der Vollständigkeit halber hier aufgeführt.



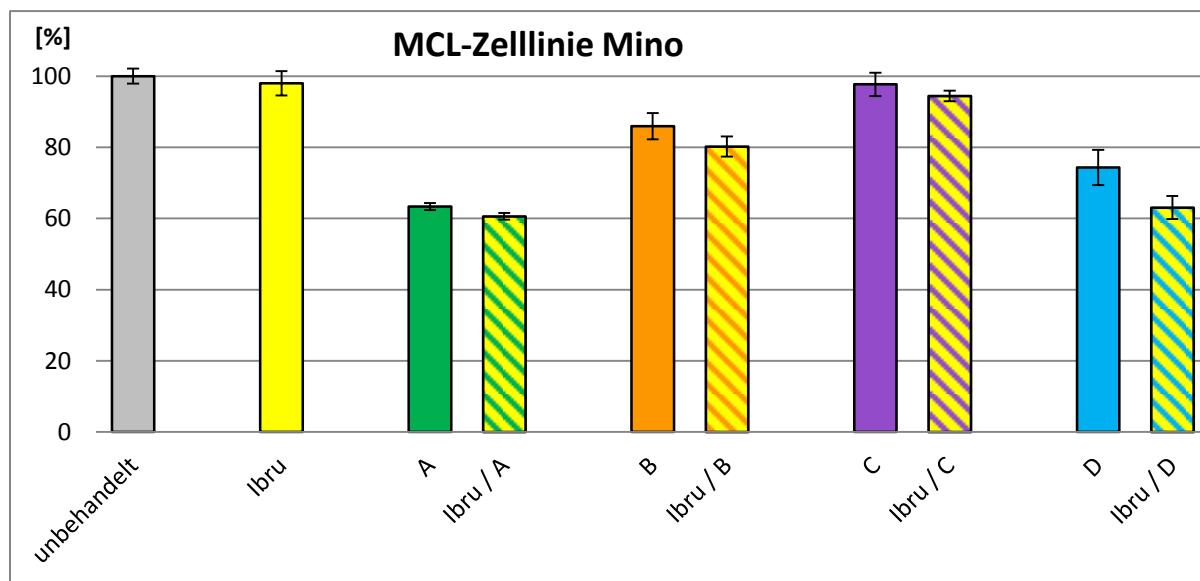
**Abbildung 8c: Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei Granta 519**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Ibru/A, Ibru/B, Ibru/C und Ibru/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinie Granta 519 für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

(d)

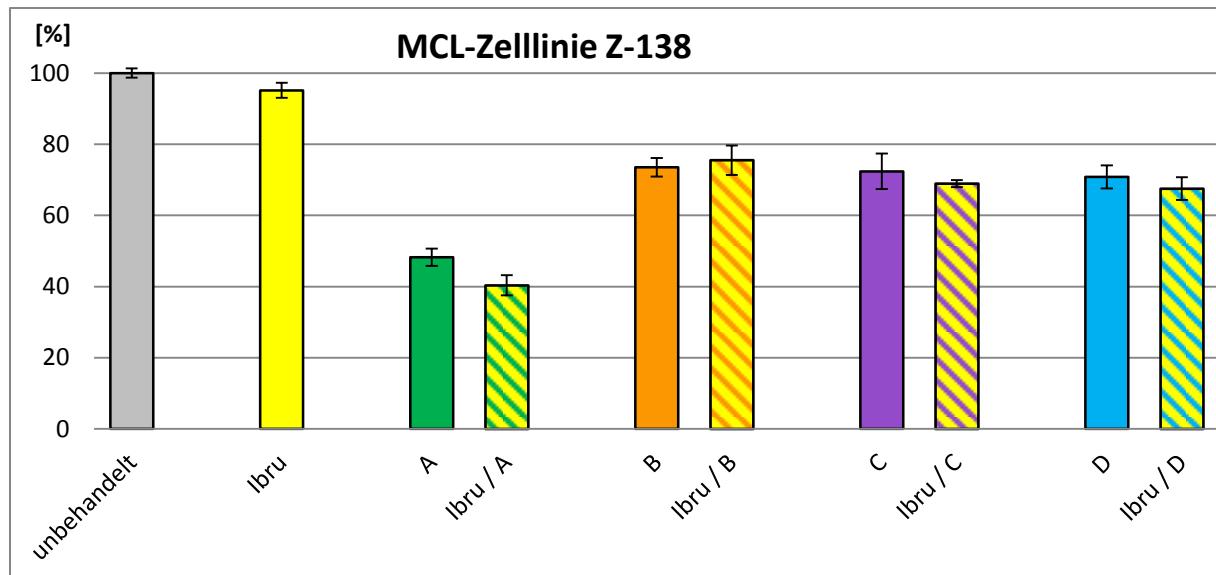


(e)



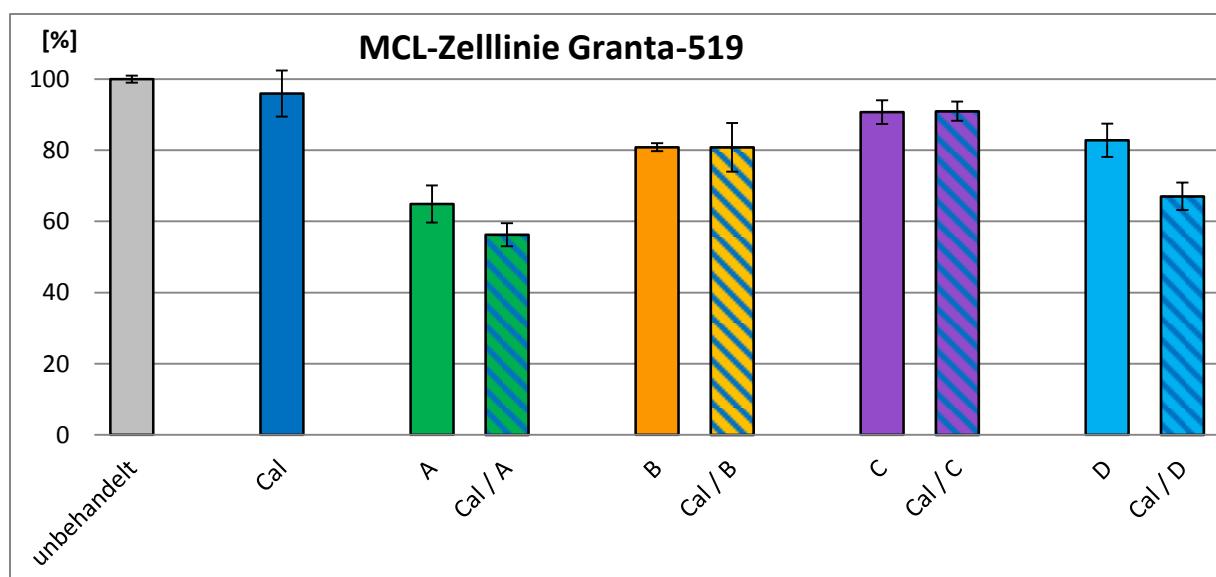
### Abbildung 8d/e: Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei JeKo-1 und Mino

Abb. 8d zeigt die Ergebnisse der Zelllinie JeKo-1, Abb. 8e stellt die Ergebnisse der Zelllinie Mino dar. Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Ibru/A, Ibru/B, Ibru/C und Ibru/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinien JeKo-1 und Mino für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.



**Abbildung 8f: Kombinations-Therapie mit Ibrutinib bei Z-138**

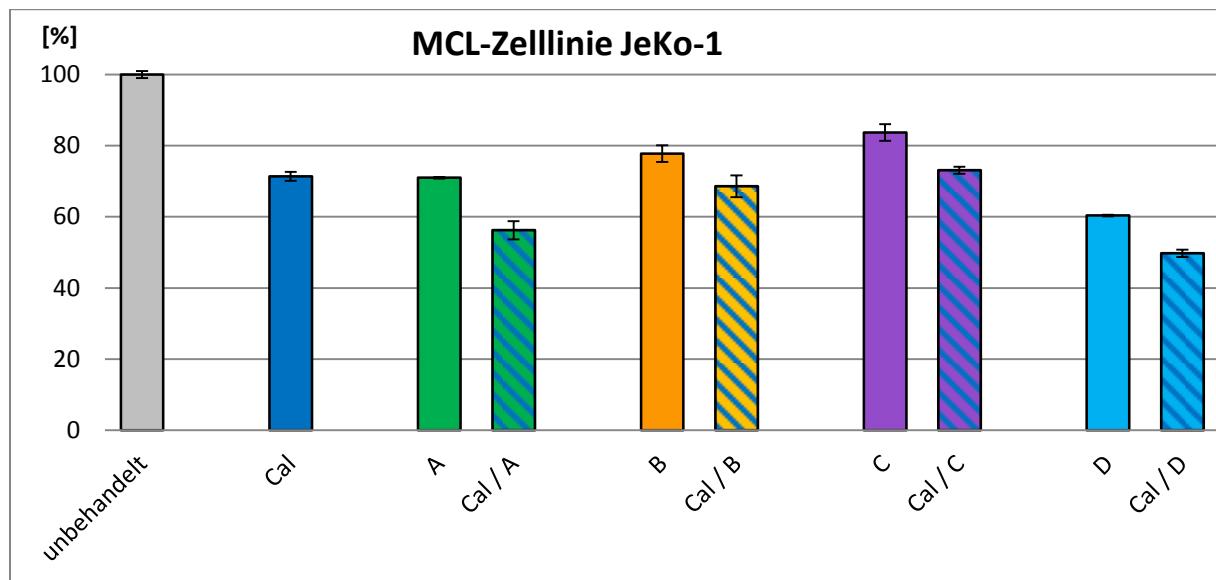
Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Ibru/A, Ibru/B, Ibru/C und Ibru/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinie Z-138 für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.



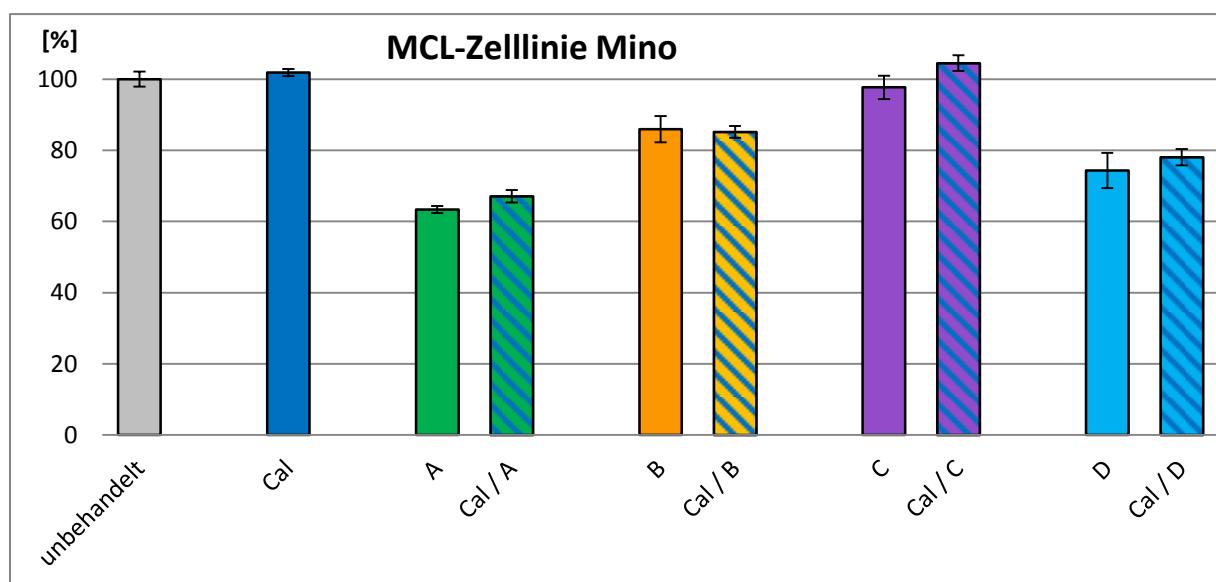
**Abbildung 12c: Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei Granta 519**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Idelalisib (Cal), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Cal/A, Cal/B, Cal/C und Cal/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinie Granta 519 für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

(d)

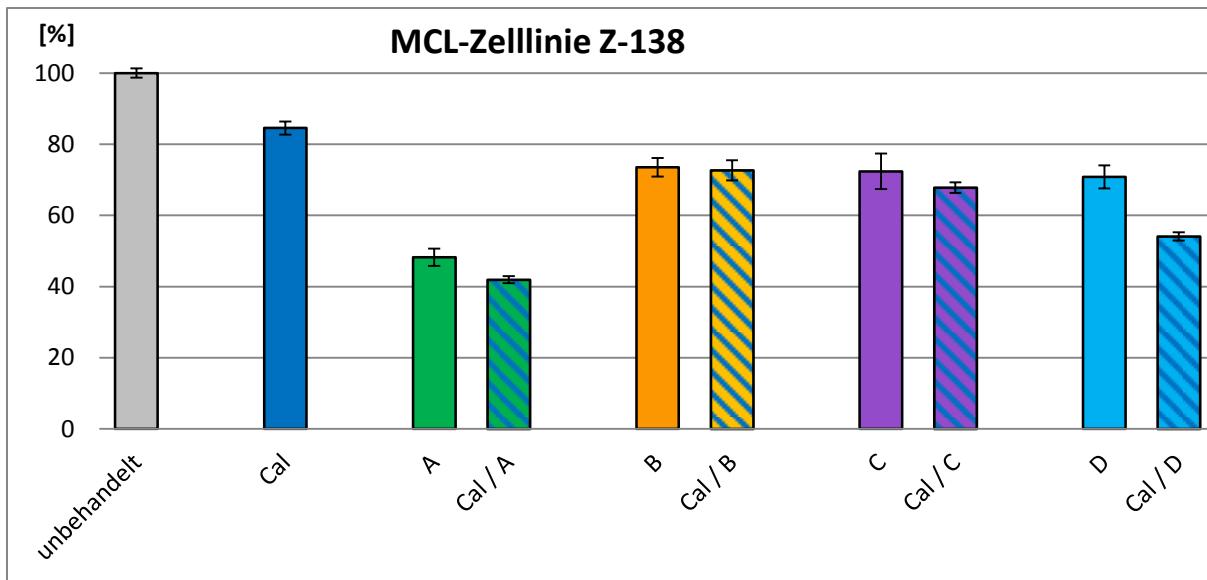


(e)



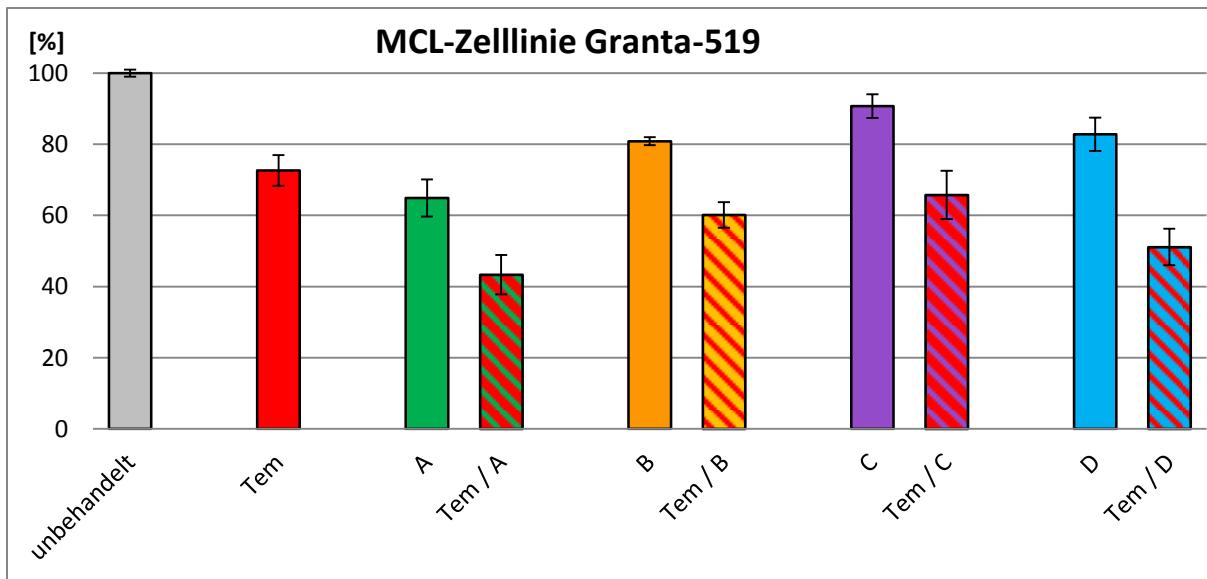
**Abbildung 12d/e: Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei JeKo-1 und Mino**

Abb. 12d zeigt die Ergebnisse der Zelllinie JeKo-1, Abb. 12e stellt die Ergebnisse der Zelllinie Mino dar. Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Idelalisib (Cal), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Cal/A, Cal/B, Cal/C und Cal/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinien JeKo-1 und Mino für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.



**Abbildung 12f: Kombinations-Therapie mit Idelalisib bei Z-138**

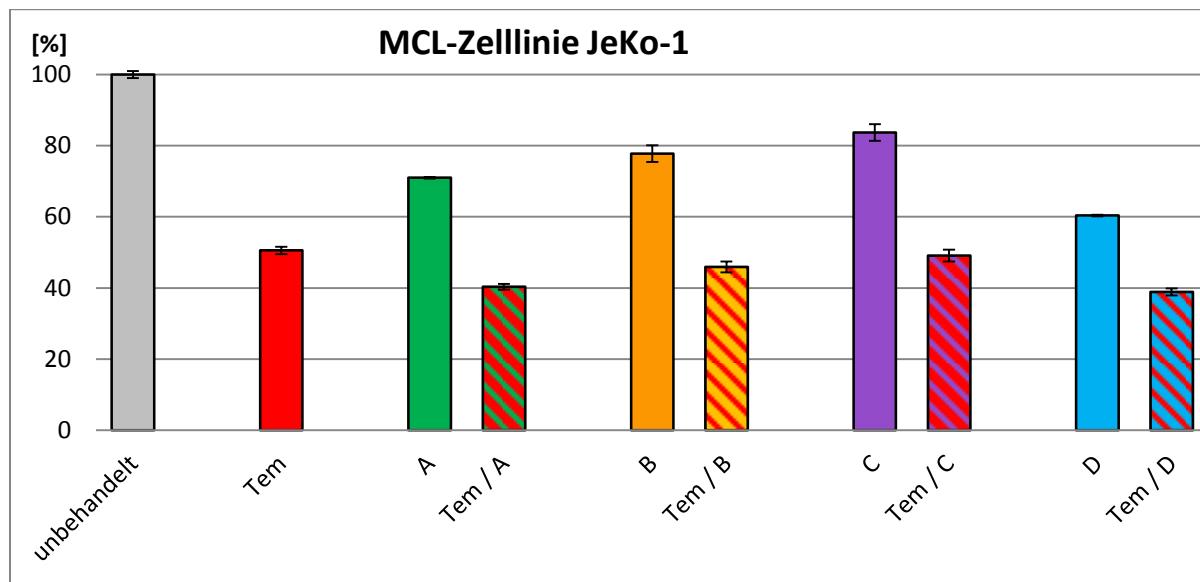
Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Idefalisib (Cal), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Cal/A, Cal/B, Cal/C und Cal/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinie Z-138 für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.



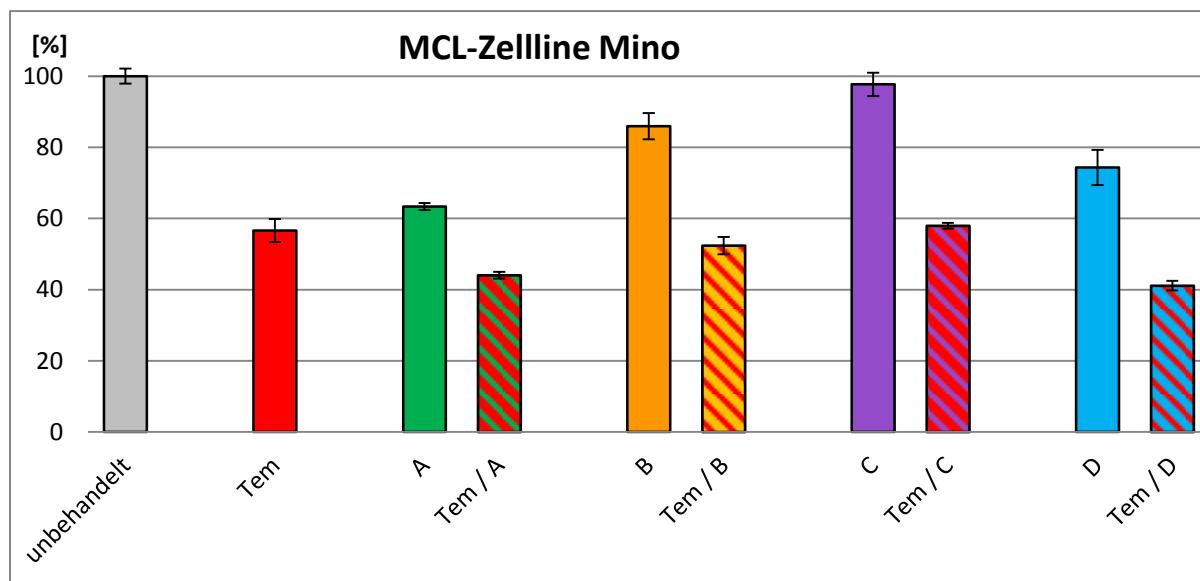
**Abbildung 16c: Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei Granta 519**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Temsirolimus (Tem), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Tem/A, Tem/B, Tem/C und Tem/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der Zelllinie Granta 519 für 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

(d)

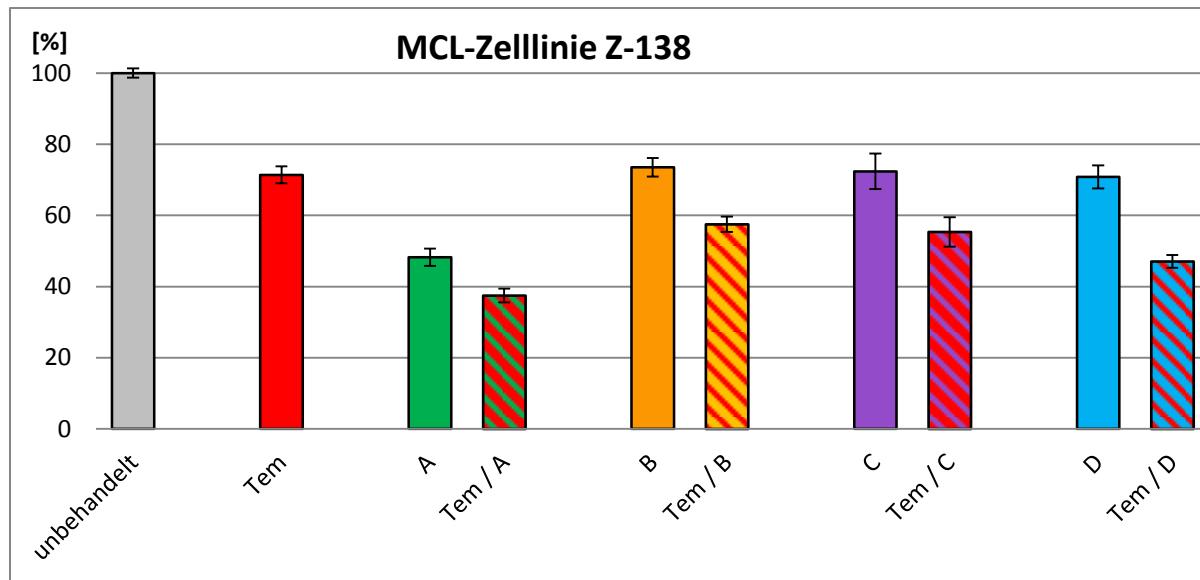


(e)



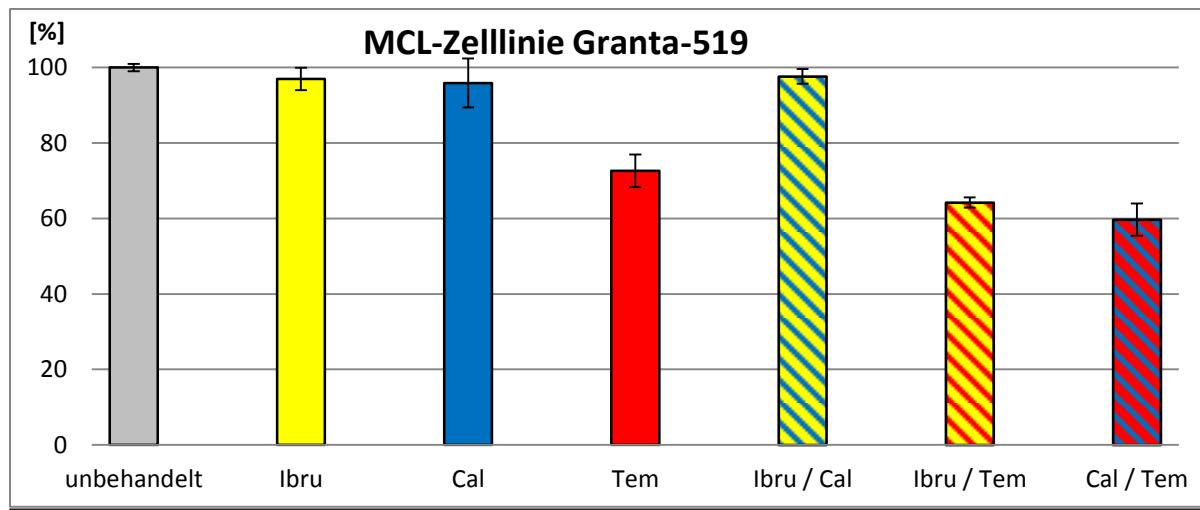
**Abbildung 16d/e: Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei JeKo-1 und Mino**

Abb. 16d zeigt die Ergebnisse der Zelllinie JeKo-1, Abb. 16e stellt die Ergebnisse der Zelllinie Mino dar. Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Temsirolimus (Tem), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Tem/A, Tem/B, Tem/C und Tem/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinien JeKo-1 und Mino für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.



**Abbildung 16f: Kombinations-Therapie mit Temsirolimus bei Z-138**

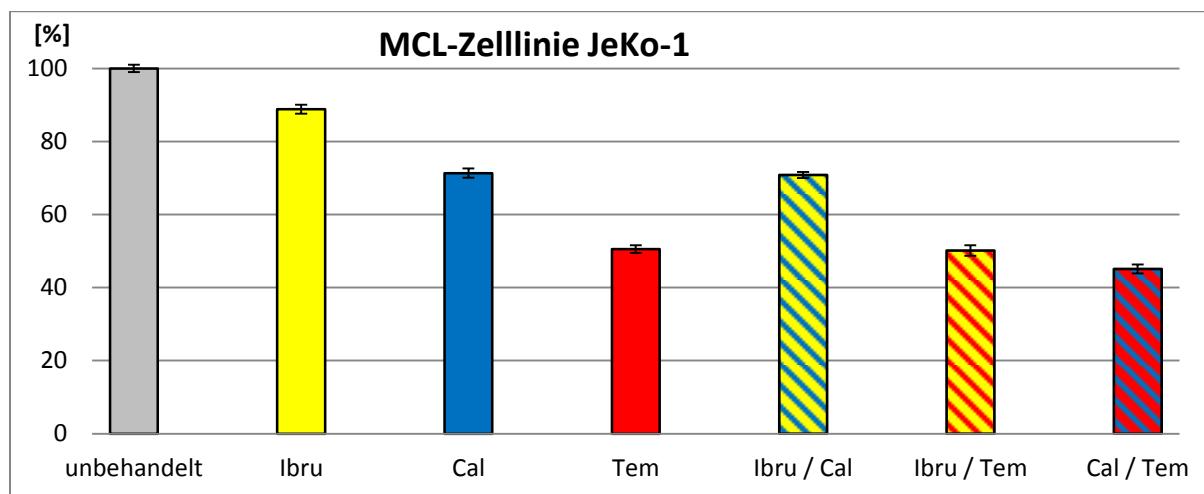
Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Temsirolimus (Tem), Cytarabin (A), Bendamustin (B), Cisplatin (C), Dexamethason (D) und deren Kombinationen Tem/A, Tem/B, Tem/C und Tem/D behandelten Zellen. Es wurden Zellen der Zelllinie Z-138 für 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.



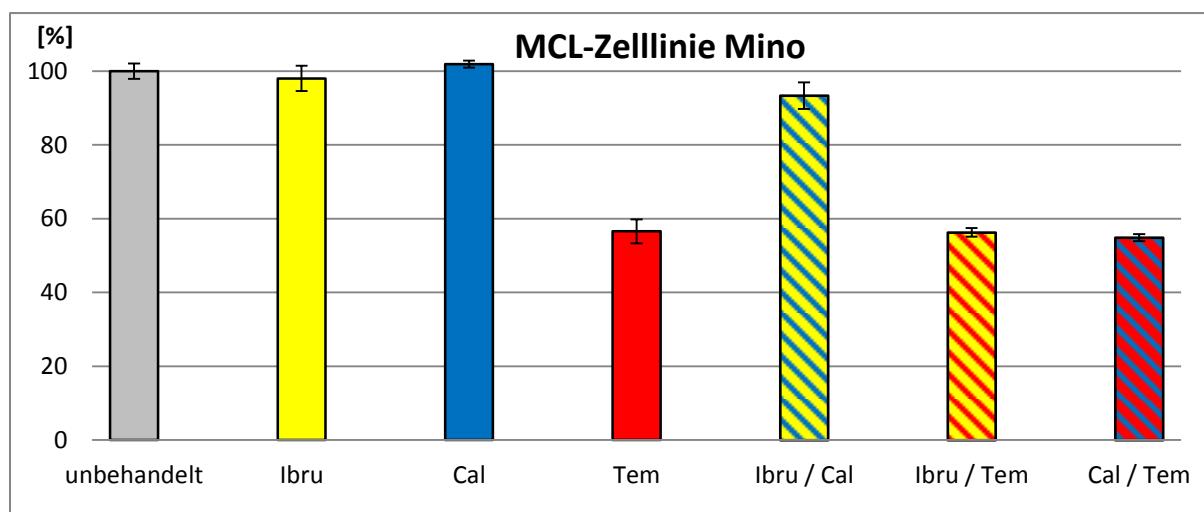
**Abbildung 19c: Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei Granta 519**

Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Idelalisib (Cal), Temsirolimus (Tem) und deren Kombinationen Ibru/Cal, Ibru/Tem und Cal/Tem behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinie Granta 519 für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.

(d)

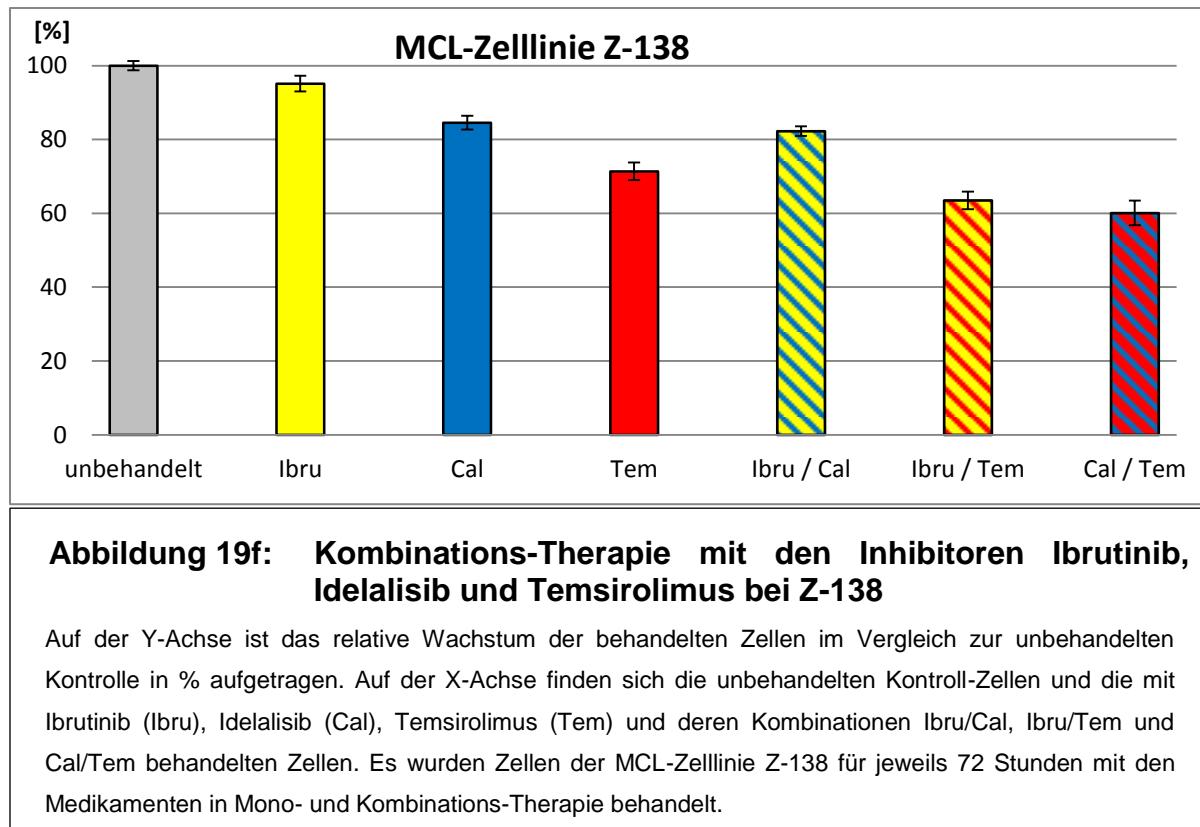


(e)



**Abbildung 19d/e: Kombinations-Therapie mit den Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Temsirolimus bei JeKo-1 und Mino**

Abb. 19d zeigt die Ergebnisse der Zelllinie JeKo-1, Abb. 19e stellt die Ergebnisse der Zelllinie Mino dar. Auf der Y-Achse ist das relative Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in % aufgetragen. Auf der X-Achse finden sich die unbehandelten Kontroll-Zellen und die mit Ibrutinib (Ibru), Idelalisib (Cal), Temsirolimus (Tem) und deren Kombinationen Ibru/Cal, Ibru/Tem und Cal/Tem behandelten Zellen. Es wurden Zellen der MCL-Zelllinien JeKo-1 und Mino für jeweils 72 Stunden mit den Medikamenten in Mono- und Kombinations-Therapie behandelt.



## 12.1 Veröffentlichte Teilespekte dieser Arbeit

T. Lautenschläger, M. Weinkauf, M. Dreyling

*The Effect of Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor PCI-32765 on mantle cell lymphoma in monotherapy and combination treatment.*

13. Herrschinger Hämato-Onkologie-Symposium 2011, Posterpräsentation, Herrsching 2011

## 12.2 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meiner Familie und bei Alexander Brand für die immerwährende Unterstützung und Geduld bedanken. Zu jeder Zeit standet ihr mir mit Rat und Tat zur Seite.

Großer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Martin Dreyling, der mich mit seinem Enthusiasmus für die onkologische Forschung begeistert hat. In den wöchentlichen Labmeetings sorgte er mit Ratschlägen und konstruktiver Kritik für immer neue Motivation.

Bei Dr. Marc Weinkauf und Dr. med. Anna Zöllner möchte ich mich sehr für die Betreuung bedanken. Sie waren im Labor bei jeder Frage für mich da und haben die alltägliche Arbeit maßgeblich erleichtert. Ihre positive Art, Geduld und Hilfsbereitschaft zeichnen die beiden besonders aus. Vielen lieben Dank dafür!

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. Grit Hutter, Yvonne Zimmermann und Stephan Bayerl. Sie alle waren tolle Kollegen und die gemeinsame Arbeit im Labor hat mir sehr viel Spaß gemacht.

Ohne die Unterstützung aller genannten Personen wäre es mir unmöglich gewesen meine Dissertationsschrift fertigzustellen. Euch allen Herzlichen Dank!

### 12.3 Lebenslauf

<u>Name:</u>	Tina Lautenschläger
<u>Geburtsdatum und -ort:</u>	08.07.1988 in Friedrichshafen am Bodensee
<u>Staatsangehörigkeit:</u>	Deutsch
 <u>Schulische Ausbildung:</u>	
1994 - 1998	Grundschule Neufrach
1998 - 2007	Gymnasium am Bildungszentrum Markdorf
06/2007	Abitur (Note 1,5)
 <u>Hochschulbildung:</u>	
2007 - 2014	Studium der Humanmedizin an der LMU München
09/2009	1. Ärztliche Prüfung (Note 2,5)
05/2011 – 10/2012	praktischer Teil der Promotion
12/2012 - 12/2013	Praktisches Jahr
-	Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie (Dermatologie)
-	Zentralklinikum Augsburg (Chirurgie)
-	Zentralklinikum Augsburg (Innere Medizin)
06/2014	2. Ärztliche Prüfung und Approbation (Note 1,0)
09/2014 – 06/2015	Promotionssemester an der LMU München
 <u>Berufliche Ausbildung:</u>	
Seit 07/2015	Ärztin in Fachweiterbildung für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie am Universitätsklinikum Leipzig