

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
KLINIK DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

Zielgerichtete Therapien beim Mantelzelllymphom
– Der neue CDK4/6-Inhibitor Abemaciclib in Mono-
und Kombinationstherapie

Dissertation

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

vorgelegt von
Luca Fischer

aus
Berlin

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: **Prof. Dr. med. Martin Dreyling**

Mitberichterstatter: **Prof. Dr. Christina Rieger**
Prof. Dr. Marcus Hentrich

Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin: **Dr. med. Andrea Mayer**

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

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2019

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iii
Abstract	v
Häufig verwendete Abkürzungen	vi
1. Einleitung	1
1.1. Mantelzelllymphom	1
1.1.1. Definition und Epidemiologie	1
1.1.2. Morphologie, Immunphänotypisierung und Zytogenetik	1
1.2. Diffus-großzelliges B-Zell Lymphom	2
1.2.1. Definition und Epidemiologie	2
1.2.2. Morphologie, Immunphänotypisierung und Zytogenetik	3
1.3. Klinische Präsentation, Therapie und Prognose von MCL und DLBCL	5
1.4. Zellzyklusregulation: CCND1 / Cyclin D1 und CDKs sowie deren Inhibition	8
1.5. Intrazelluläre Signalwege	9
1.5.1. B-Zell Rezeptor Signalweg	10
1.5.2. PI3K-Akt-mTOR Signalweg	12
1.6. Verwendete Inhibitoren	13
2. Ziel der Arbeit	16
3. Material und Methoden	17
3.1. Material	17
3.1.1. Zellkultur	17
3.1.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	17
3.1.3. Durchflusszytometrie	18
3.1.4. Western-Blot	19
3.1.5. Medium-throughput Assays	21
3.1.6. Puffer und Lösungen	21
3.1.7. SDS-Page Gele	22
3.1.8. Geräte	23
3.2. Methoden	23
3.2.1. Zellkultur	23
3.2.2. PCR	25
3.2.3. Durchflusszytometrie	26
3.2.4. Western-Blot	28
3.2.5. Medium-throughput Assays	29
3.2.6. Gewinnung von Lymphozyten aus Primärmaterial und Kombinationsversuche mit primären Zellen	32
3.2.7. Statistik	33
4. Ergebnisse	34
4.1. Zellzählung und FACS: Starke Wachstumsinhibition ohne Einfluss auf Viabilität oder Apoptose bei Behandlung mit Abemaciclib	34
4.2. Medikamentenkombinationen können zu Verstärkung oder Abschwächung der beteiligten Pharmaka führen	42
4.2.1. Abemaciclib und Ibrutinib	42
4.2.2. Abemaciclib und Cytarabin	44
4.2.3. Abemaciclib und weitere Inhibitoren des B-Zell Rezeptor Signalweges	50
4.2.4. Primäre Zellen behandelt mit Abemaciclib alleine und in Kombination	52

4.3.	<i>Western-Blot</i>	54
5.	<i>Diskussion</i>	60
5.1.	<i>Abemaciclib hemmt Zellwachstum beim MCL durch potenten G1-Arrest</i>	60
5.2.	<i>Die Wirkung Abemaciclibs auf weitere molekulare Ziele</i>	63
5.3.	<i>MCL sprechen aufgrund von Cyclin D1-Überexpression besser auf Abemaciclib an als DLBCL</i>	64
5.4.	<i>Die Kombination von Abemaciclib mit Inhibitoren des BCR Signalweges ist synergistisch</i>	66
5.5.	<i>Hemmung von Btk und weiteren Kinasen der Tec-Familie führt zu Syk Dephosphorylierung</i>	69
5.6.	<i>Abemaciclib hat sequenzspezifische Wechselwirkungen mit Cytarabin beim MCL</i>	70
5.7.	<i>Primäre Zellen sind nicht immer das Modell der ersten Wahl in Zellkultur</i>	71
5.8.	<i>Methodische und andere Einschränkungen dieser Arbeit</i>	72
5.9.	<i>Schlussfolgerung</i>	74
6.	<i>Referenzen</i>	76
	<i>Anhang</i>	90
	<i>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</i>	91

Danksagung

Im Folgenden möchte ich allen Personen danken, die mich während dieser Arbeit mit großer Geduld, Input, Erfahrung unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Dreyling. In zahlreichen Gesprächen hat er den Fortgang meiner Arbeit mit vielen wichtigen Impulsen begleitet und stand mir stets unterstützend zu Seite.

Danken möchte ich außerdem meiner Betreuerin Dr. Andrea Mayer, für ihren Input vor allem während meiner Zeit im Labor. Natürlich danke auch ganz herzlich Dr. Grit Hutter, Yvonne Zimmermann und meinen beiden Mitdoktoranden Markus Irgler und Bianca Freysoldt, die mich mit Erfahrung, Ideen und toller Zusammenarbeit bei der Erstellung dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben.

Ganz herzlich will ich darüber hinaus meinen Eltern, Renate und Eux, sowie meinen Geschwistern, Sarah und Pina, danken, die mich seit jeher unterstützt und gestärkt haben. Zu guter Letzt geht ein besonderes Dankeschön an Filipa Queirós, die mich während meiner Arbeit so viele Male angespornt und motiviert hat.

Ich widme diese Arbeit meinem Großvater und Vorbild Walther Dürr.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in

- Fischer, L. *et al.*, *The Novel CDK4/6-Inhibitor Abemaciclib Induces Early G1-Arrest in MCL Cell Lines, Sensitizes Cells to Cytarabine Treatment and Is Additive with Ibrutinib*; *Blood* 2015; 126(23): p. 5124 (Abstract)
- Fischer, L. *et al.*, *CDK4/6-Inhibition by Abemaciclib Induces Potent Early G1-Arrest in MCL Cell Lines and Shows Sequence-Specific Interactions with Cytarabine and Ibrutinib*; *Haematologica* 2017; 102(s1): p.575 Abstract #E1402

Abstract

Mantle cell lymphoma is characterized by the t(11;14)(q13;q32) translocation juxtaposing the CCND1 gene locus to the Ig heavy chain locus, resulting in a cyclin D1 overexpression. Cyclin D1 forms a complex with CDK4 and 6 and deactivates Rb through phosphorylation, leading to cell cycle progression from G1- into S-phase. Abemaciclib is a novel potent small molecule CDK4/6 inhibitor and therefore poses a rational approach in MCL therapy. In this study we evaluated the effect of abemaciclib as a single agent and in combination therapy with inhibitors of the BCR pathway or cytarabine in MCL and DLBCL cells.

We demonstrate, that abemaciclib as a single agent leads to potent growth inhibition in low nanomolar doses through a strong, nontoxic and reversible G1-arrest in three of four MCL cells, whereas the effect on DLBCL cells is less distinct. The G1-arrest is induced by dephosphorylation of Rb in all cell lines with mostly unaffected expression levels of CDK4 or cyclin D1. However, we further show that abemaciclib leads to dephosphorylation of Akt on position Ser473 and Thr308 in sensitive but not in resistant MCL cell lines, imposing a possible role for Akt as a biomarker for abemaciclib resistance.

With the abemaciclib effect being largely nontoxic and reversible, combination with other therapeutic agents is important. Here we show, that especially the sequential combination of an abemaciclib induced G1-arrest followed by ibrutinib or cytarabine poses great potential for synergism but also carries a considerable risk of antagonistic interactions. While ibrutinib acts synergistically when administered in G1-arrest, a lasting G1-arrest protects MCL cells from cytotoxic treatment by cytarabine. However, by exploiting the reversible effect of abemaciclib, MCL cells can be released from G1-arrest through inhibitor washout. This leads to a synchronized S-phase entry and sensitization to cytarabine treatment. Therefore, rational drug combinations may achieve major benefits, if possible adverse interactions are considered and studied carefully prior to testing.

Further studies need to address the interactions with other targeted approaches of the B-cell receptor pathway to better understand the underlying molecular mechanisms.

Häufig verwendete Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
A	Amper
ABC-Typ	Activated B-Cell Typ
Akt	Proteinkinase B
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
ASCT	Autologous Stem-Cell Transplantation
ATM	Angia-Teleangiectasia-Mutated
BCR	B-Cell Receptor
BLNK	B-Cell Linker Protein
bp	Base pairs
CAK	Cyclin Activating Kinase
CDK	Cyclin Dependent Kinase
COO	Cell of Origin
DAG	Diacylglycerol
DLBCL	Diffuse Large B-Cell Lymphoma
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
FCγRIIB	Low Affinity Immunoglobulin Gamma Fc Region Receptor II-B
FOXO	Forkhead Box Protein O
g	Gramm
GC-Typ	Germinal Centre Typ
GEP	Gene Expression Profiling
g _n	Standard Gravity
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin Heavy Chain
IgL	Immunglobulin Light Chain
IHC	Immunhistochemie
IP ₃	Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat
IPI	International Prognostic Index
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif

kg	Kilogramm
L	Liter
MCL	Mantle Cell Lymphoma
mg	Milligramm
min	Minute
MIPI	MCL International Prognostic Index
mL	Milliliter
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
mTORC	Mechanistic Target of Rapamycin Complex
NF-AT	Nuclear Factor Of Activated T-Cells
NF- κ B	Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-Cells
OS	Overall Survival
PDK1	Phosphoinositide-Dependent Kinase-1
PFS	Progression Free Survival
PH	Pleckstrin Homology
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidyl-Inositol-(4,5)-Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidyl-Inositol-(3,4,5)-Trisphosphat
PKB	Proteinkinase B / Akt
PKC β	Proteinkinase C β
PLC γ 2	Phospholipase Gamma C 2
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
Rb	Retinoblastom-Protein
rpm	Rounds per Minute (Umdrehungen pro Minute)
SD	Standard Deviation
SH-2	Src-homology 2
SHIP-1/2	SH-2 Containing Inositol 5' Polyphosphatase 1 und 2
Syk	Spleen Tyrosin Kinase
TBI	Total Body Irradiation
TNF	Tumor Nekrose Faktor
V	Volt

1. Einleitung

1.1. Mantelzelllymphom

1.1.1. Definition und Epidemiologie

Das MCL ist 1992 aus dem zentrozytischen Lymphom der Kiel Klassifikation hervorgegangen^[1, 2]. Es macht mit einer Inzidenz von 0,4/100 000 Einwohner pro Jahr etwa 6 – 8 % aller Non-Hodgkin Lymphome aus^[3, 4] und hat ein medianes Überleben von 4-7 Jahren^[5-7]. Das Mantelzelllymphom (MCL) ist in circa 90 % der Fälle^[8, 9] charakterisiert durch die Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ ^[10], welche zur Überexpression des in normalen B-Zellen nicht exprimierten^[11] Cyclin D1 führt. CCND1 (auch Bcl-1, PRAD-1) wird dabei unter die Kontrolle eines Enhancers des IgH Gens auf Chromosom 14 gestellt^[12-14]. Mittlerweile können beim MCL zwei pathogenetisch grundlegend verschiedene Subtypen unterschieden werden^[15]: Das „klassische“ Mantelzelllymphom zeichnet sich durch vor allem nodale und extranodale Manifestationen und einen verhältnismäßig aggressiven Krankheitsverlauf aus. Die variable Region des IGH Locus (IGHV) ist nicht mutiert und SOX11 ist positiv. Der zweite Typ zeichnet sich durch einen eher leukämischen und indolenten Verlauf aus; IGHV ist hier in aller Regel mutiert und SOX11 negativ^[15, 16].

1.1.2. Morphologie, Immunphänotypisierung und Zytogenetik

Der Name „Mantelzelllymphom“ leitet sich von dem typischen Wachstumsmuster in frühen Krankheitsstadien ab: Die Tumorzellen umgeben Keimzentren und ersetzen so den physiologischen Follikelmantel^[1, 17]. Das Mantelzelllymphom kann Histopathologisch in vier Entitäten unterteilt werden, wobei die „klassische“ Form mit fast 90 % den mit Abstand größten Anteil ausmacht^[18, 19]. Es handelt sich hierbei um einheitliche kleine bis mittelgroße Zellen mit unregelmäßigen, teils bohnenartig geformten Kernen ohne Nukleoli^[1, 2, 10, 18, 19]. Das Chromatin ist weniger kondensiert als in normalen Lymphozyten üblich, aber nicht ganz so locker wie bei Lymphoblasten^[18]. Die restlichen circa 10 % der MCL lassen sich in einen kleinzelligen, einer chronisch lymphatischen B-Zell Leukämie (B-CLL) ähnlichen, einen pleomorphen und damit histopathologisch dem DLBCL ähnelnden, sowie in einen blastischen, eher einer akuten lymphatischen Leukämie entsprechenden Subtyp unterteilen^[19]. Der blastische Subtyp hat im Vergleich zum diffusen Typ ein möglicherweise verringertes Gesamtüberleben^[20]. Die prognostische Wertigkeit dieser Subtypen bleibt jedoch kontrovers und ist wahrscheinlich nicht ausschlaggebend^[19]. Das Wachstumsmuster des MCL ist in 80 % diffus und 20 % nodulär.

Anders als die rein histopathologische Einteilung lassen Wachstumsmuster und Proliferationsaktivität durchaus Rückschlüsse auf die Prognose zu. Ein hoher Mitoseindex und starke Ki67-Expression, sowie diffuses Wachstumsmuster sind mit einem aggressiven Krankheitsverlauf und vermindertem Gesamtüberleben korreliert^[1, 19, 20]. Dies wird weiter unterstützt durch Ergebnisse aus Gene Expression Profiling (GEP) Studien, bei denen die Expression einer „Proliferation Signature“ als stärkster Prädiktor für kürzeres Gesamtüberleben identifiziert werden konnte^[9, 21]. Immunhistochemisch zeichnet sich das Mantelzelllymphom neben der Überexpression von Cyclin D1 und der Expression typischer B-Zell Marker (CD19, CD20, CD79a) durch die Expression von IgM, IgD und die Koexpression des T-Zell-Antigens CD5 sowie CD43 bei fehlender Expression von CD10 und CD23 aus^[1, 2].

Zytogenetisch definiert das Mantelzelllymphom die in über 90 % der Fälle auftretende Translokation t(11;14)(q13q32)^[8]. Es kommt zu einer Überexpression von Cyclin D1 durch Juxtaposition des CCND1 Locus auf Chromosom 11 zum IgH Locus auf Chromosom 14^[14]. In einigen Fällen treten Amplifikationen im CDK4-Gen oder vermehrte MDM2-Expression auf, was vermutlich mit einem besonders aggressiven Krankheitsverlauf assoziiert ist^[16, 22]. Weitere häufige zytogenetische Veränderungen betreffen Deletionen des Tumorsuppressorgens p53 auf Chromosom 17p, im Angia-Teleangiectasia-Mutated (ATM)-Gen auf Chromosom 11q und im Locus 9p21.3, in welchem sich unter anderem die Tumorsuppressoren CDKN2A, CDKN2B und MTAB befinden^[8]. Des Weiteren kann es zu Beeinträchtigungen etwa von CDKN2C, FAF1, BCL2L11 und zu Mutationen der TNF Superfamilie auf Chromosom 19p13.1 kommen^[8]. Neben zytogenetischen Veränderungen wurden auch Veränderungen in der DNA-Methylierung, unter anderem von p16, CDKN2B, NOTCH1 und CD5 beschrieben^[23, 24].

1.2. Diffus-großzelliges B-Zell Lymphom

1.2.1. Definition und Epidemiologie

Das DLBCL ist das häufigste aller B-NHL und stellt selbst eine sehr heterogene Gruppe an Erkrankungen dar^[25]. Es ist wahrscheinlich die häufigste B-Zell Neoplasie, wenngleich Angaben dazu in der Literatur schwanken. Für eine 2006 veröffentlichte große Register-Studie beispielsweise wurden 114 548 Patienten mit lymphatischer Neoplasie in den Vereinigten Staaten untersucht. Danach war bei der weißen und asiatischen Bevölkerung das DLBCL mit 21 und 29 % die häufigste und bei der schwarzen Bevölkerung nach Plasmazellneoplasien mit 15 % die zweithäufigste lymphatische Neoplasie^[26]. Nach einer neueren Studie von Laurent *et al.* mit 42 145 untersuchten Proben des französischen Lymphopath Networks handelt es sich

bei 32,4 % der nicht kutanen Lymphome um DLBCL^[4]. Die Inzidenz beträgt 3-5/100 000 Einwohner pro Jahr, das mediane Alter liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr^[27]. Den weitaus größten Teil davon machen die DLBCL, „not otherwise specified“ (nos) aus, welche weiter nach Ursprungszelle (Cell of Origin, COO) in „activated B-cell Typ“ (ABC) und „germinal centre Typ“ (GC) unterteilt werden können (Tabelle 1^[15, 28]).

2016 WHO classification of mature lymphoid, histiocytic, and dendritic neoplasms - DLBCL

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), nos
Germinal center B-cell type
Activated B-cell type
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the central nervous system (CNS)
Primary cutaneous DLBCL, leg type
EBV ⁺ DLBCL, nos
EBV ⁺ mucocutaneous ulcer
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
ALK ⁺ large B-cell lymphoma
HHV8 ⁺ DLBCL, nos
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma

Tabelle 1: Auszug aus der 2016-Revision der WHO-Klassifikation lymphatischer Neoplasien^[15].

1.2.2. Morphologie, Immunphänotypisierung und Zytogenetik

Es existieren aktuell verschiedene Methoden, die unterschiedlich ausgeprägte prognostische Wertigkeit besitzen, Patienten mit DLBCL in Untergruppen einzuteilen.

Histomorphologisch werden hauptsächlich drei Gruppen innerhalb des „DLBCL, nos“ unterschieden: Zentroblastisch, immunoblastisch^[29] und anaplastisch^[28, 30]. Allgemein kommt es zu einer Verdrängung der ursprünglich knotigen Lymphknotenarchitektur durch diffuse Proliferation von großen B-Lymphozyten. Beim zentroblastischen Typ handelt es sich dabei überwiegend um flächenhaft verteilte B-Zellen mit großen, vesikulären Nuklei und prominenten Nukleoli. Das immunoblastische DLBCL zeichnet sich durch die starke

Ausbreitung von Immunoblasten aus, welche hierbei bis zu 90 % der Lymphozyten im Tumor ausmachen können^[31]. Sie sind charakterisiert durch einen runden Nukleus mit einem einzelnen, eosinophilen, meist zentralen Nukleolus^[31, 32]. Bei der kleinen Untergruppe mit anaplastischer Morphologie handelt es sich um überwiegend große, polymorphe Zellen mit viel Zytoplasma. Sie sind teilweise polynukleär und zeigen eine hohe Mitoserate. Die Kerne sind unregelmäßig geformt und im Gegensatz zum anaplastischen T-Zell Lymphom ist das anaplastische DLBCL fast ausschließlich ALK negativ^[33].

Immunphänotypisch exprimiert das DLBCL charakteristischerweise den Oberflächenmarker CD45, sowie verschiedene pan-B-Zell-Marker wie CD19, CD20, CD22, CD79a und PAX5^[32]. DLBCL vom GCB Typ (s.u.) exprimieren in der Regel CD10 und Bcl-6, wohingegen beim ABC Typ eine stärkere Expression von MUM1/IRF-4, und Cyclin D2 gezeigt werden konnte^[34, 35]. Diskutiert wird auch eine stärkere Expression von NF-κB bei den ABC Typ DLBCL^[36, 37]. Weitere, in einem Teil der Fälle exprimierte Oberflächenmarker sind Bcl-2 in 30-50 %, CD30 vor allem beim anaplastischen Subtyp, sowie Ki67 mit einer Varianz der Ki67 exprimierenden Zellen zwischen 40 und über 90 %^[28, 32]. Auch molekularbiologisch ist das Diffus-großzellige B-Zell Lymphom eine äußerst heterogene Gruppe. Alizadeh *et al.* beschrieben erstmals im Jahr 2000 anhand von großen Gene Expression Profiling Analysen die Existenz von zwei sich sehr unterschiedlich verhaltenden Entitäten innerhalb des DLBCL: Eine Gruppe zeigte ein Expressionsmuster, welches dem normaler Keimzentrumszellen stark ähnelte, die zweite Gruppe zeigte ein Expressionsmuster, das stärker dem *in vitro* aktivierter B-Zellen glich^[35]. Durch die in den letzten Jahren immer breitere Verfügbarkeit von GEP^[38] hat sich eine molekulargenetische Einteilung nach Cell of Origin (COO) als der rein morphologischen Klassifikation überlegen erwiesen. Demnach können beim DLBCL zwei bis drei Entitäten mit signifikant unterschiedlichem Overall Survival (OS) und Event Free Survival (EFS) unterschieden werden^[35, 36, 39]. Dies findet sich nun auch in der überarbeiteten Version der WHO Klassifikation lymphatischer Neoplasien (2016) in Form einer Unterteilung in germinal centre B-cell-like Lymphoma (GCB) und non-GC Lymphoma, beziehungsweise activated B-cell-like Lymphoma (ABC), wieder^[15]. Da im klinischen Setting GEP jedoch nicht flächendeckend verfügbar ist, wurden verschiedene weitere Ansätze entwickelt und getestet, mit denen DLBCL in GCB und non-GC eingeteilt werden können. Colomo *et al.* (2003) konnten dabei durch Einteilung nach immunhistochemischer Färbung von CD10, Bcl-6, CD138 und MUM1 keinen signifikanten Unterschied im OS beider Entitäten feststellen^[40]. Die Gruppe um Hans *et al.* (2003) hingegen entwickelte einen Algorithmus, nachdem GCB und non-GC allein durch Färbung von CD10, Bcl-6 und MUM1 mit einer Sensitivität von 71 % für GCB

und 88 % für non-GC unterschieden werden konnten^[34]. Morphologisch scheint zumindest die Gruppe immunoblastischer Lymphome mit den non-GC DLBCL und damit mit schlechterem Outcome zu korrelieren^[31]. In der überarbeiteten Version der WHO Klassifikation lymphatischer Neoplasien von Swerdlow *et al.* (Blood 2016) wird die Unterscheidung von GCB und non-GC DLBCL mittels immunhistochemischer Färbung (IHC), beispielsweise nach dem Hans Algorithmus^[34], empfohlen^[15]. Es sollte jedoch beachtet werden, dass weiterhin kein Konsens über die diagnostische und prognostische Wertigkeit von IHC Färbungen zur Klassifikation von GCB und non-GC besteht, mit mehreren zuletzt veröffentlichten Arbeiten, die die Aussagekraft der IHC bei Bestimmung der DLBCL Subgruppen in Frage stellen^[40, 41]. Andere molekulargenetische Veränderungen, die beim DLBCL auftreten können, sind beispielsweise die vom folliculären Lymphom bekannte Translokation t(14;18)(q32;q21)^[42]. Diese betrifft in etwa 20 % der Fälle Patienten mit DLBCL, überwiegend des GCB Typs^[36, 43, 44]. Translokationen von Bcl-6 auf 3q27 finden sich in 20 – 40 % der Fälle, wahrscheinlich häufiger bei Patienten mit ABC-Typ DLBCL^[45], und können unterschiedlichste Translokationspartner haben^[8, 45-47]. In 5-15 % der Fälle findet sich die ansonsten für das Burkitt Lymphom charakteristische Translokation t(8;14)(q24;q32) bei der c-Myc unter die Kontrolle des IgH-Locus gestellt wird^[48, 49]. Die bei einer Vielzahl maligner Erkrankungen auftretende Mutation des Tumorsuppressors p53 lässt sich beim DLBCL in etwa 20 % der Fälle nachweisen und ist mit beeinträchtigtem Gesamtüberleben verbunden^[8, 50]. Des Weiteren wird die prognostische Wertigkeit sogenannter „double Hit“ Lymphomas intensiv diskutiert. Hierbei kommt es zeitgleich zu zytogenetischen Veränderungen von Myc und entweder Bcl-2 oder Bcl-6, was wahrscheinlich mit deutlich schlechterem Outcome verbunden ist^[11, 51, 52]. Interessanterweise wird dadurch die Unterteilung nach COO bereits in Frage gestellt. So scheinen beispielsweise die Unterschiede im Gesamtüberleben zwischen GCB und ABC-Typ zu verschwinden, wenn die Patienten nach Myc⁺ / Bcl-2⁺ Doppelpositivität eingeteilt werden^[53].

1.3. Klinische Präsentation, Therapie und Prognose von MCL und DLBCL

Klinisch manifestiert sich das Mantelzelllymphom in den allermeisten Fällen in einem späten Stadium (III/IV nach Ann Arbor-Klassifikation^[54]). Das mediane Erkrankungsalter liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr, etwa 75 % der Patienten sind männlich^[55, 56]. In 60-80 % der Fälle liegt bei Diagnosestellung ein Knochenmarksbefall vor, eine Milzbeteiligung findet

sich bei etwa der Hälfte aller Patienten^[55, 57]. In 25 % der Fälle kommt es zusätzlich zu einem Befall der Leber, bei 20-60% der Patienten ist der Gastrointestinal (GI)-Trakt im Sinne einer lymphomatösen Polyposis betroffen^[2]. Etwas weniger als die Hälfte der Patienten zeigen bei Krankheitsbeginn B-Symptome^[55, 56].

Das DLBCL präsentiert sich in der Regel mit schmerzloser Lymphadenopathie und in 25 % der Fälle als „limited Disease“, das heißt im Ann Arbor-Stadium I/II, ohne bulky Disease^[25, 32]. Das mediane Erkrankungsalter liegt wie beim MCL zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr^[27]. Über die Hälfte der Patienten sind älter als 60 Jahre, nicht selten sind jedoch auch sehr junge Patienten betroffen^[58]. B-Symptome werden von etwa 20 % der Patienten berichtet, extranodaler Befall ist häufig und meist gastrointestinal lokalisiert^[27, 32, 59]. Allerdings ist der Befall von so gut wie jedem Organ möglich, wodurch das DLBCL eine Vielzahl verschiedener Erkrankungen imitieren kann^[32].

Die Erstlinientherapie besteht sowohl beim MCL als auch beim DLBCL aus einer Immunchemotherapie^[10, 25, 60]. Als Immunchemotherapie hat sich beim Mantelzelllymphom bei jungen Patienten ein alternierendes Regime aus je drei Zyklen R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon) und R-DHAP (Rituximab, Dexamethason, Cytarabin, Cisplatin) mit anschließender Ganzkörperbestrahlung (TBI) und autologer Stammzelltransplantation (ASCT)^[10, 61, 62] durchgesetzt. Bei älteren Patienten oder Patienten, die aus anderen Gründen nicht für ein intensiviertes Therapieregime in Frage kommen, können entweder Bendamustin oder CHOP jeweils in Kombination mit Rituximab eingesetzt werden. Hierbei zeigt R-Bendamustin wahrscheinlich ein etwas besseres Ansprechen und weniger unerwünschte Arzneimittelwirkungen^[10, 63]. Alle Patientengruppen scheinen von einer sich der Induktionstherapie anschließenden Rituximab Erhaltungstherapie zu profitieren^[64, 65]. Etwa 10-15 % der Mantelzelllymphome zeigen einen indolenten Verlauf. Sie zeichnen sich in der Regel durch geringe Tumorlast und niedrige Proliferationsaktivität mit hypermutierten IGHV sowie SOX11 Negativität aus^[15]. In diesen Fällen kann ein abwartendes Vorgehen unter engmaschiger Verlaufskontrolle angebracht sein^[66, 67]. Für das DLBCL gilt seit den 1970er Jahren CHOP als Standardtherapie^[68] und seit der Ergänzung von Rituximab^[69] konnte noch für kein anderes Regime Überlegenheit gegenüber R-CHOP gezeigt werden^[70-72]. Damit bleiben sechs Zyklen R-CHOP beim DLBCL weiterhin Erstlinientherapie^[25, 60]. Allein bei Patienten mit limited Disease in den frühen Krankheitsstadien I und II kann sowohl beim DLBCL als auch beim MCL eine Verkürzung der Therapiedauer auf drei bis vier Zyklen Immunchemotherapie in Kombination mit Strahlentherapie erwogen werden^[2, 25]. Hierdurch

können vereinzelt auch beim MCL Langzeiterfolge erzielt werden^[73]. ASCT ist beim DLBCL, im Gegensatz zum MCL, Hochrisikopatienten und Patienten nach Rezidiv vorenthalten^[2, 25].

Molekulare Therapieansätze: Durch ein immer breiteres Verständnis der Pathogenese hämatologischer Erkrankungen wurden in den letzten Jahren neben Rituximab eine Vielzahl an zielgerichteten Therapien entwickelt und getestet^[74]. Zugelassen sind für das MCL aktuell der mTOR-Inhibitor Temsirolimus^[75], der Proteasom-Inhibitor Bortezomib^[76, 77], der Immunmodulator Lenalidomid^[78, 79] und der Bruton's Tyrosin Kinase (Btk)-Inhibitor Ibrutinib^[6]. Bei refraktärem oder rezidiviertem Mantelzelllymphom erwies sich davon zuletzt der Btk-Inhibitor Ibrutinib in einer Phase 3 Studie von Dreyling *et al.* mit einem progressionsfreien Überleben von 14,6 Monaten als sehr effektiv, gut verträglich und dem mTOR-Inhibitor Temsirolimus (PFS 6,2 Monate) deutlich überlegen^[6].

Prognose: Zur Risikostratifizierung bei Lymphomen wurde 1993 der „International Prognostic Index“ (IPI) und der „age adjusted IPI“ für Patienten unter 60 Jahren (aaIPI) entwickelt^[80]. Dieser ist für das DLBCL in einer 2007 überarbeiteten Form („revised IPI“ (R-IPI))^[81] noch immer gültig und klinisch relevant. Risikofaktoren (RF) sind hierbei das Alter über 60 Jahren, ein Ann Arbor Stadium von III/IV, eine erhöhte Laktat-Dehydrogenase (LDH), ein Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Status von 2 oder mehr und mehr als eine extranodale Manifestation. Nach R-IPI kann in 3 Risikogruppen unterteilt werden: 1.: Sehr Gut (0 RF; 4-Jahres OS 94 %), 2.: Gut (1-2 RF; 4-Jahres OS 79 %) und 3.: Schlecht (3-5 RF; 4-Jahres OS 55%)^[80, 81]. Für das MCL besitzen IPI und R-IPI nur eingeschränkte prognostische Wertigkeit^[2]. E. Hoster und M. Dreyling schlugen deshalb 2008 auf Basis einer Metaanalyse von insgesamt 455 Patienten einen spezifischen Risikoscore für das MCL – den MCL International Prognostic Index (MIPI) – vor^[55]. Es gehen Alter, ECOG Status über 1 sowie LDH- und Leukozyten-Erhöhung als Risikofaktoren ein^[55]. Der MIPI wurde bereits in mehreren randomisierten internationalen Studien bestätigt und lässt die Differenzierung der Patienten in drei Gruppen zu (1.: niedriges Risiko, 5-Jahres OS 83 %; 2.: mittleres Risiko, 5-Jahres OS 63 %; 3.: hohes Risiko, 5-Jahres OS 34 %)^[56, 82]. Neben MIPI spielt der anhand von Ki67-Expression festgestellte Proliferationsindex prognostisch ebenfalls eine große Rolle: Je höher der Proliferationsindex, desto schlechter ist die Prognose^[19].

1.4. Zellzyklusregulation: CCND1 / Cyclin D1 und CDKs sowie deren Inhibition

1984 wurde der heute als CCND1 bekannte und für Cyclin D1 kodierende Gen-Lokus auf Chromosom 11 von Tsujimoto und Kollegen erstmals und zwar in Lymphomzellen mit t(11;14) Translokation, beschrieben^[83]. Damals B-cell lymphoma/leukemia 1 (Bcl-1) genannt, wurde bereits von Tsujimoto eine Rolle in der Pathogenese hämatologischer Erkrankungen postuliert^[83]. Anfang der 1990er Jahre wurde schließlich im Bcl-1 Locus „PRAD-1“ als kodierend für Proteine aus der Familie der Zellzyklus regulierenden Cycline identifiziert^[12] und offiziell CCND1 genannt^[84]. Mittlerweile wurden große Fortschritte im Verständnis der Bedeutung der D-Typ Cycline gemacht^[85]: Der Zellzyklus besteht grob aus vier Phasen, der G1-Phase mit Proteinsynthese und Zellwachstum, gefolgt von der S-Phase, in welcher die DNA-Synthese mit Verdopplung des Erbguts stattfindet, der G2-Phase und schließlich der M-, der Zellteilungsphase^[86, 87]. Vor Eintritt in S- und M-Phase muss eine gesunde Zelle dabei sogenannte Checkpoints passieren, womit der Eintritt in die nächste Zellzyklusphase kontrolliert wird^[87]. Die Cycline D1-3 haben beispielsweise für sich genommen so gut wie keine enzymatische Aktivität^[88], sind aber in Verbindung mit den Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4/6) maßgeblich für den Zellzyklusprogress von der G1- in die S-Phase verantwortlich^[88-94]. Hierbei geht Cyclin D1 eine Verbindung mit CDK4 oder 6 ein^[91-94]. Dieser Komplex wird von einer Cyclin-aktivierenden Kinase (CAK, CDK7 und Cyclin H) phosphoryliert und dadurch aktiviert^[92]. Hauptreaktionspartner ist das Retinoblastom-Protein (Rb), ein Tumorsuppressorgen, das in hypophosphoryliertem Zustand sowohl den Transkriptionsfaktor E2F, der die Transkription für den Zellzyklusprogress essentieller Proteine bewirkt, als auch Histondeacetylasen (HDAC) bindet und somit den G1/S-Phase-Übergang verhindert^[94-96]. Im Laufe der Zellzyklusprogression wird Rb von verschiedenen Proteinkomplexen sukzessive hyperphosphoryliert und dadurch größtenteils inaktiviert: Der aktivierte Cyclin D1-CDK4/6 Komplex phosphoryliert Rb initial und es kommt zur verstärkten Expression von Cyclin E und CDK2. Cyclin E-CDK2 ist dann in der Lage Rb weiter zu phosphorylieren, was zur vollständigen Inaktivierung und damit zur Freisetzung von Transkriptionsfaktoren der E2F Familie führt^[89, 94, 97]. E2F führt zur Transkription einer Reihe von Cyclinen, CDKs und weiterer für die G1/S-Phase-Progression erforderlicher Proteine, darunter unter anderem auch Cyclin E, CDK2 und Rb^[98, 99]. Es ist wichtig anzumerken, dass die Rolle der E2F Proteinfamilie möglicherweise komplexer ist als ursprünglich angenommen und neben zellzyklusregulierenden, zusätzlich eine Reihe weiterer Funktionen haben könnte^[100].

Gegenspieler dieser Ereigniskette sind in einer gesunden Zelle 2 große Gruppen natürlicher Inhibitoren, die den G1/S-Phase-Übergang kontrollieren. Proteine der INK4 Familie hemmen CDK4/6 und bestehen aus p15^{INK4A}, p16^{INK4B}, p18^{INK4C} und p19^{INK4D}. Proteine aus der Cip/Kip Familie, vor allem p21^{CIP1} und p27^{KIP1}, hemmen den Cyclin E-CDK2 Komplex^[86, 94], werden aber wiederum zu Beginn des G1/S-Phase Übergangs durch Cyclin D-CDK4/6 von Cyclin E-CDK2 wegtitriert. Dies trägt ebenfalls zur verstärkten Aktivierung von Cyclin E/CDK2 und damit zur weiteren Hyperphosphorylierung von Rb bei^[93, 94]. Bei Betrachtung dieser Daten wird deutlich, dass der aktivierte Cyclin D1-CDK4/6 Komplex am Anfang einer langen Kette an Ereignissen steht, welche mit einer Vielzahl negativer und positiver feedback Schleifen schließlich in der S-Phase und damit in der DNA-Synthese endet. Diese zentrale Stellung im Zellzyklus in Zusammenschau damit, dass Cyclin D1 und CDK4/6 in einem Großteil unterschiedlichster maligner Erkrankungen überexprimiert sind^[88, 101], macht Cyclin D-CDK4/6 zu einem attraktiven Ziel für neue Therapieansätze. Da Cyclin D alleine keine enzymatische Aktivität besitzt, ist es ein schwieriges Ziel für neue Inhibitoren, wohingegen CDK4/6 durch small Molecules bereits potent inhibiert werden kann^[88]. Schon Anfang der 1990er Jahre konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass CDK4 durch verstärkte Expression von Transforming Growth Factor Beta 1 (TGFβ1) supprimiert werden und dadurch ein G1-Arrest mit Hypophosphorylierung von Rb erreicht werden kann^[90]. Nach der darauffolgenden Entwicklung mehrerer unselektiver CDK Inhibitoren, war PD 0332991 (Palbociclib) der erste hoch selektive small molecule CDK4/6-Inhibitor^[94, 102]. Momentan sind mit Palbociclib, Ribociclib und Abemaciclib drei selektive CDK4/6-Inhibitoren in klinischer Testung^[103, 104]. Das Mantelzelllymphom ist für CDK4/6-Inhibition durch die zentrale Rolle der Translokation t(11;14) besonders interessant (s.o.): Durch die in so gut wie allen Fällen krankheitsdefinierende Überexpression von Cyclin D1 stellt die Hemmung der Zellzyklusprogression durch selektive Hemmung des Cyclin D1-CDK4 Komplexes einen rationalen und auf Basis molekularer pathogenetischer Erkenntnisse beruhenden Therapieansatz dar.

1.5. Intrazelluläre Signalwege

Eine Darstellung aller Signalwege, welche durch Inhibition verschiedener intrazellulärer Ziele betroffen sein könnten, sprengt den Rahmen dieser Arbeit. Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Signalwege und hierbei vor allem solche, die Auswirkungen auf den Zellzyklus haben, zum besseren Verständnis kurz dargestellt.

1.5.1. B-Zell Rezeptor Signalweg

Der B-Zell Rezeptor (BCR) und die von ihm angestoßenen Signalwege sind unentbehrlich für B-Zellentwicklung, -differenzierung und -überleben^[105-108]. Das zeigt sich beispielhaft an Patienten mit X-linked Agammaglobulinämie, hier ist das Gen für Btk defekt, was zu extrem erniedrigten Gammaglobulin-Spiegeln und einer stark beeinträchtigten B-Zellfunktion führt^[109]. Der B-Zell Rezeptor selbst besteht aus einer extrazellulären, Liganden-bindenden Domäne und einer Transmembrandomäne. Diese bestehen aus vier kovalent gebundenen Immunglobulinen (Ig): Zwei identische Ig schwere Ketten (IgH) und zwei identische Ig leichte Ketten (IgL)^[110]. Der intrazelluläre Teil zur Signalweiterleitung besteht aus den nicht-kovalent gebundenen Effektor-Molekülen Iga und Igβ^[110]. Nach Bindung eines Liganden kommt es zur Oligomerisation und Konformationsänderung des Iga/Igβ Heterodimers von seiner geschlossenen zu einer offenen Stellung^[111]. Die Konformationsänderung wird wahrscheinlich durch Lyn-vermittelte Phosphorylierung am Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif (ITAM) herbeigeführt^[112]. Nach neueren Erkenntnissen von Mkaddem *et al.* übt Lyn an BCR ITAMs allerdings möglicherweise eher eine inhibitorisch regulierende Funktion aus (ITAMi) und für deren aktivierende Phosphorylierung könnte die Src Kinase Fyn zuständig sein^[113]. Sowohl Lyn als auch Fyn werden nach Bindung des Liganden räumlich mit dem BCR zusammengeführt um damit ihre phosphorylierenden Funktionen ausüben zu können^[110]. Lyn spielt außer am BCR selbst noch eine weitere Rolle bei der negativen Rückkopplung von BCR Signalen: Es phosphoryliert und aktiviert CD22 und den Low Affinity Immunglobulin Gamma Fc Region Receptor II-B (FCγRIIB)^[114], welche als Dockingstation für Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) und SH-2 Containing Inositol 5' Polyphosphatase 1 und 2 (SHIP-1/2) dienen^[115]. Beide üben hemmende Funktionen auf den B-Zell Rezeptor Signalweg aus^[116, 117].

Nach der Aktivierung des BCR Signalweges werden durch die Öffnung und ITAM-Phosphorylierung von Iga/Igβ Bindungsstellen für Effektoren mit Src-homology 2 (SH-2) Domäne frei^[106, 118] und es werden eine Vielzahl an unterschiedlichen Kinasen und Effektor Molekülen zum BCR rekrutiert. Hierunter spielen vor allem die Spleen Tyrosin Kinase (Syk) und die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)^[106], mit ihren nachgeschalteten Reaktionspartnern, eine entscheidende Rolle. Syk besitzt eine Vielzahl direkter und indirekter Wirkungen, welche sich gegenseitig auf unterschiedlichste Weise beeinflussen. Einerseits wird beispielsweise Btk, wahrscheinlich unter Vermittlung von B-cell Linker Protein (BLNK) und abhängig von seiner SH2-Domäne, durch Syk phosphoryliert und aktiviert^[119]. Andererseits aktiviert Syk aber auch zusammen mit CD19 und dem BCR die PI3-Kinase, was zur Produktion von Phosphatidyl-

Inositol-(3,4,5)-Trisphosphat (PIP₃) führt^[120, 121]. PIP₃ wiederum rekrutiert Btk aufgrund seiner PH-Domäne zur Zellmembran, an der es aktiviert wird^[122].

Ein weiteres von Syk durch Phosphorylierung aktiviertes Schlüsselmolekül ist die Phospholipase C Gamma 2 (PLC γ 2)^[123]. PLC γ 2 wird darüber hinaus zusätzlich BLNK vermittelt zur Zellmembran transloziert und dort von Btk phosphoryliert, ein Schritt der möglicherweise zur vollständigen Aktivierung von PLC γ 2 notwendig ist^[124-126]. PLC γ 2 hydrolysiert Phosphatidyl-Inositol-(4,5)-Bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG)^[110]. IP₃ führt nun zu einer intrazellulären Kalizium (Ca²⁺)-Erhöhung durch Ca²⁺-Einstrom aus dem endoplasmatischen Reticulum (ER) und von Extrazellulär^[110, 127]. Dies führt unter anderem zur Aktivierung der Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B-Cells (NF- κ B) und Nuclear Factor Of Activated T-Cells (NF-AT) Signalwege^[128]. DAG und das von IP₃ bereitgestellte Ca²⁺ führen außerdem zur Aktivierung der Proteinkinase C β (PKC β) und stoßen damit die Aktivierung verschiedener Signalwege der MAP-Kinase-Familie an^[110, 128, 129]: p38 MAPK wird phosphoryliert und transloziert in den Zellkern, was unter anderem zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Myc-Associated Factor X (MAX) und Activating Transcription Factor 2 (ATF-2) führt^[106, 130]. PKC β und Ca²⁺ aktivieren die c-Jun N-terminale Kinasen 1 und 2 (JNK1/2), welche ebenfalls in den Zellkern translozieren und zur Aktivierung von ATF-2 und c-Jun führen^[106, 131, 132]. c-Jun beeinflusst als Transkriptionsfaktor unter anderem die Expression von Cyclin D1 und ist damit im Zellzyklus wichtig für den Übertritt von der G1- in die S-Phase^[133]. Es muss allerdings angemerkt werden, dass die genaue Rolle der verschiedenen Proteinkinase C Isoformen noch nicht endgültig geklärt ist und die Phosphorylierung von JNK1/2 und damit die Aktivierung von c-Jun eventuell stärker durch PKC δ und PKC θ als durch PKC β erfolgt^[134-137]. Der dritte Pfad der MAPK Familie endet in der Aktivierung und Zellkerntranslokation von den Extracellular-signal Regulated Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) mit anschließender Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-Myc und ETS Domain-Containing Protein Elk-1 (Elk-1)^[106, 130]. Dieser Weg wird einerseits durch PKC vermittelte Phosphorylierung der Rapidly Accelerated Fibrosarcoma Kinase Raf-1^[138] und andererseits Growth Factor Receptor-Bound Protein 2 (Grb2) gesteuert aktiviert. Hierbei assoziieren Grb2 und Son of Sevenless (Grb2/SOS) mit phosphoryliertem BLNK und aktivieren Ras^[106]. Dies setzt die Signalkaskade Ras-Raf-MEK-ERK in Gang^[106, 110, 130].

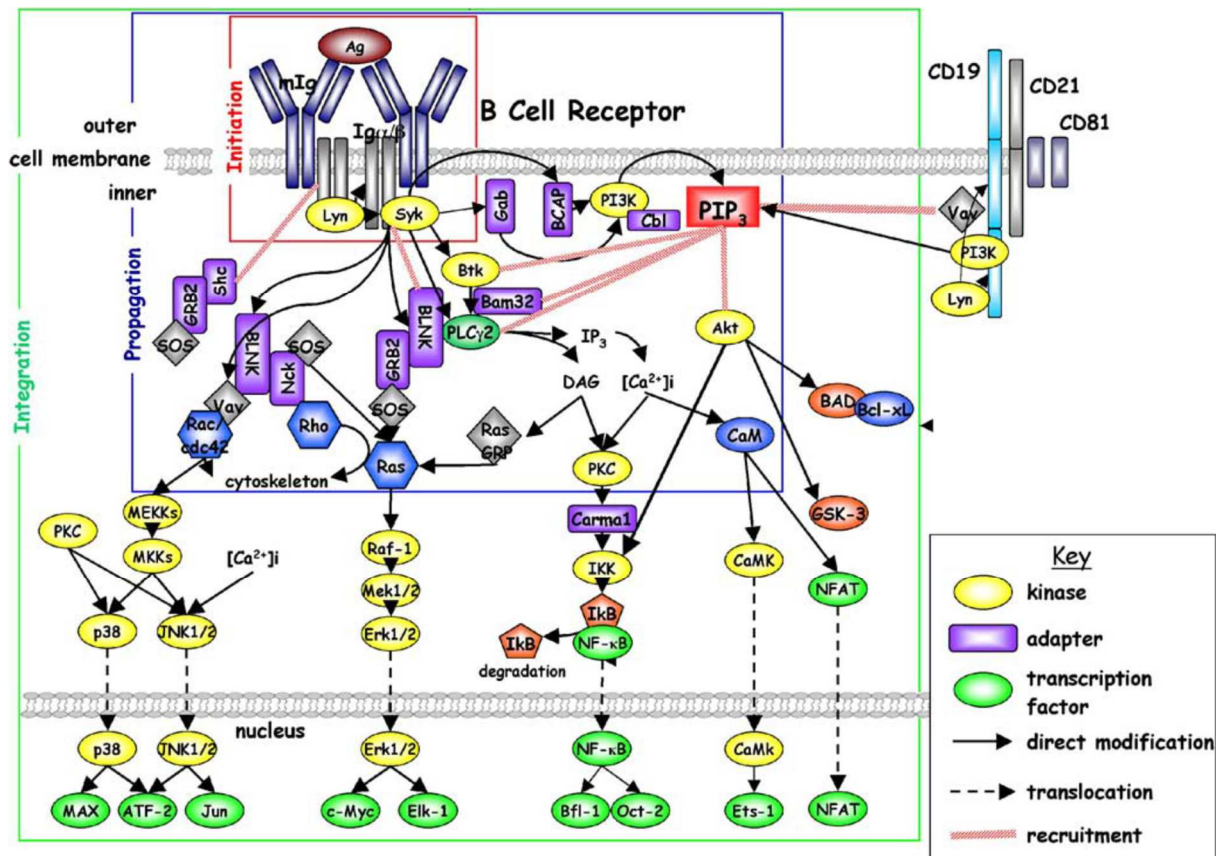


Abbildung 1: Schematische Darstellung des B-Zell Rezeptor Signalweges aus „J.M. Dal Porto et al. / Molecular Immunology 41 (2004) 599–613“

1.5.2. PI3K-Akt-mTOR Signalweg

Akt, auch Proteinkinase B (PKB) genannt, steht im Zentrum vieler verschiedener Signalwege mit Auswirkungen unter anderem auf Zellüberleben und Zellproliferation, Wachstum, Metabolismus und Angiogenese^[139]. Momentan sind drei Isoformen (Akt1, Akt2, Akt3) bekannt, von denen Akt1 im Körper am weitesten verbreitet und vor allem am Zellwachstum und -überleben beteiligt ist^[140, 141]. In einem stark vereinfachten Modell wird Akt durch Phosphorylierung an Threonin 308 und am Serin 473 der C'-hydrophoben Region, aktiviert^[142]. Diese Aktivierung erfolgt physiologischer Weise hauptsächlich durch die Bindung von Phosphatidyl-Inositol-(3,4,5)-Trisphosphat an der Zellmembran^[139, 140, 143]. Es kommt zur Interaktion von PIP₃ mit der N-terminalen Pleckstrin Homology (PH)-Domäne von Akt^[144] und dadurch zu einer Konformationsänderung^[145]. Dies ermöglicht die Phosphorylierung an Thr308 durch die ebenfalls von PIP₃ rekrutierte Phosphoinositide-Dependent Kinase-1 (PDK1)^[146]. Obwohl an Thr308 phosphoryliertes Akt bereits Aktivität besitzt, wird die volle Aktivität und Stabilität erst durch Mechanistic Target of Rapamycin Complex (mTORC) 2 vermittelte Phosphorylierung an Ser473 erreicht^[142, 147]. PIP₃ wird hauptsächlich durch Phosphorylierung

aus Phosphatidyl-Inositol-(4,5)-Bisphosphat (PIP₂) von einer aktivierten Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) synthetisiert^[143]. Die Aktivierung von PI3K wird größten Teils durch Stimuli von Rezeptor-Thyrosinkinasen (TK), G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und Ras vermittelt^[143], in B-Lymphozyten ist der BCR einer der wichtigsten Aktivatoren (s.o.). Beendet wird die PIP₃-Signaltransduktion unter anderem von dem Tumorsuppressor PTEN, welcher die Dephosphorylierung von PIP₃ zu PIP₂ katalysiert^[116, 148]. Nach Aktivierung phosphoryliert Akt seine Ziele an Serin oder Threonin^[149] und führt dadurch zu einer Vielzahl unterschiedlicher Antworten, meist zur Aktivierung oder Inhibierung des Zielproteins^[139]. Es sind mittlerweile über 100 Substrate von Akt bekannt, wobei die physiologische Relevanz bei der Mehrzahl nicht eindeutig geklärt ist^[140]. Die Funktion der drei Hauptsubstrate ist allerdings gut untersucht: Das erste identifizierte Substrat von Akt war die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3), welche mittels Phosphorylierung durch Akt gehemmt wird^[150]. Dies hat neben metabolischen, auch Folgen für den Zellzyklus: Aktives GSK-3 β wandert in den Nukleus und phosphoryliert dort unter anderem Cyclin D1 und Cyclin E. Es kommt zu deren Translokation ins Zytoplasma mit anschließendem proteosomalem Abbau^[151, 152]. Wird das gehemmt, akkumuliert Cyclin D1 im Nukleus, was in Kombination mit beispielsweise Wachstumsfaktoren den Übergang von der G1- in die S-Phase voran treiben kann^[153]. Die zweite Säule der Signalübertragung durch Akt ist die Hemmung der Transkriptionsfaktoren Forkhead Box Protein O (FOXO) durch Phosphorylierung^[140], welche wiederum unter anderem die Transkription der Zellzyklusinhibitoren p21^{CIP1} und p27^{KIP1} steigert^[139, 154]. Als dritte Säule wird mTORC1 durch Akt enthemmt, was verschiedene anabole Effekte nach sich zieht: Es kommt durch Hemmung von eIF4E Binding Protein (4EBP) und Aktivierung von p70S6 Kinase 1 (S6K1) unter anderem zur Steigerung des Proteinmetabolismus^[140, 155]. mTORC1 wird normalerweise durch den Tuberos Sclerosis Complex 2 (TSC2) und Proline-rich Akt Substrate of 40 kDa (PRAS40) gehemmt, wobei TSC2 wahrscheinlich die entscheidende Rolle spielt^[140, 156, 157]. TSC2 und PRAS40 werden durch Phosphorylierung von Akt inaktiviert, was zu einer indirekten Aktivierung von mTORC1 und den damit verbundenen zellwachstumsfördernden Prozessen führt^[140, 155].

1.6. Verwendete Inhibitoren

<i>Inhibitor</i>	<i>Wirkmechanismus</i>	<i>Klinische Studien / Zulassung</i>
Abemaciclib	CDK4/6-Hemmung an ATP-Bindungsstelle ^[158]	Phase III bei HR+, HER2-metastasiertem Mamma-Ca.

		(MONARCH 2; NCT02107703; MONARCH 3 NCT02246621)
Ibrutinib	Btk Hemmung an ATP-Bindungsstelle ^[159]	Zulassung für CLL, MCL und M. Waldenström ^[160]
Idelalisib	PI3K δ -Hemmung ^[161]	Zulassung für CLL/SLL und FL ^[162]
Copanlisib	PI3K α/δ -Hemmung ^[163]	Phase III bei R-refraktärem iNHL (CHRONOS-2; NCT02369016)
IBL-301	PI3K/mTOR/PIM-1-Hemmung ^[164]	Präklinische Testung
LY3023414	PI3K/mTOR/DNA-PK-Hemmung an ATP-Bindungsstelle ^[165]	Phase II bei Prostata-Ca. (NCT02407054) und PE-NSCLC (NCT02443337)
Venetoclax	Bcl-2-Hemmung durch Bindung der Hydrophoben Taschen P2 und P4 ^[166]	Zulassung für CLL ^[167]

Table 2: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten small molecule Inhibitoren und ihrer maßgeblichen Wirkweisen. HR+: Hormonrezeptor positiv; HER2-: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 negativ; Mamma-Ca.: Mamma Karzinom; CLL: chronisch lymphatische Leukämie; MCL: Mantelzelllymphom; M. Waldenström: Morbus Waldenström; SLL: small lymphocytic Lymphoma; FL: folliculäres Lymphom; R: Rituximab; iNHL: indolentes Non-Hodgkin Lymphom; Prostata-Ca.: Prostata Karzinom; PE-NSCLC: nicht-kleinzelliges Plattenepithelkarzinom der Lunge

Abemaciclib (LY2835219; [5-(4-Ethyl-piperazin-1-ylmethyl)-pyridin-2-yl]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropyl-2-methyl-3H-benzoimidazol-5-yl)-pyrimidin-2-yl]-amine) ist ein oral verfügbarer small molecule Inhibitor, der durch kompetitive Hemmung der ATP-Bindungsstelle zur Inaktivierung der CDKs 4 und 6 führt^[158]. Klinisch zeigte sich Abemaciclib in frühen Phase I / II Studien recht gut verträglich, die häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen beinhalteten Diarrhoe, Neutropenie, Übelkeit und Fatigue^[104, 168, 169]. In der Phase 3 Studie MONARCH 2 zeigte Abemaciclib in Kombination mit Fluvestrand bei Mammakarzinompatientinnen mit Progress nach endokriner Therapie einen deutlichen Vorteil im progressionsfreien Überleben (PFS) (16.4 Monate gegenüber 9.3 Monaten im Kontrollarm; HR, 0.553). Bei 15,9 % der Patientinnen musste die Therapie mit Abemaciclib aufgrund von Toxizität abgebrochen werden, bei 42,9 % wurde eine Dosisreduktion notwendig^[170]. Ebenfalls in der Interimsanalyse der MONARCH 3 Studie beweist Abemaciclib deutliche Wirksamkeit (HR 0,51 gegenüber Placebo). Hier wurde doppelblind, randomisiert und placebokontrolliert Abemaciclib in der Erstlinientherapie bei metastasiertem Mammakarzinom mit einem nichtsteroidalen Aromatasehemmer kombiniert. Die Toxizität war mit SAEs (severe adverse events) bei 27,5 % der Patientinnen im Abemaciclibarm gegenüber dem Placeboarm mit 14,9 % erhöht, häufigste Grad 3/4 Toxizitäten waren Neutropenie, Diarrhoe und Leukopenie^[171].

Ibrutinib (PCI-32765, 1-[(3R)-3-[4-Amino-3-(4-phenoxyphenyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl]piperidin-1-yl]prop-2-en-1-on) ist ein *first-in-class* oraler small molecule Inhibitor, der die

Bruton's Tyrosin Kinase durch kovalente Bindung an Cystein 481 irreversibel hemmt^[172, 173]. Ibrutinib konnte bereits gute Aktivität gegen eine Vielzahl lymphatischer Erkrankungen zeigen^[159]. Beim rezidiert / refraktären Mantelzelllymphom beispielsweise ließ sich in einer randomisierten multizentrischen Phase 3 Studie eine erhebliche Verlängerung des PFS gegenüber Temsirolimus mit 14,6 Monaten gegenüber 6,7 Monaten (HR 0,43) erreichen^[6]. In der CLL zeigen Daten aus Phase 3 Studien gute Wirksamkeit von Ibrutinib sowohl in der rezidiert / refraktären Situation als auch in der Erstlinientherapie^[174, 175]. Als substanztypische Nebenwirkung lässt sich zu Therapiebeginn, wahrscheinlich durch Ausschwemmung der Lymphozyten aus den Lymphknoten ins periphere Blut, regelmäßig eine transiente Lymphozytose beobachten^[159, 176]. Weitere unerwünschte Arzneimittelwirkungen beinhalten neben üblichen Nebenwirkungen wie Diarrhoe, Fatigue oder Infektionen auch schwerwiegendere wie Vorhofflimmern oder Blutungen^[159]. Ibrutinib erhielt bereits die Zulassung in den USA und Europa für die CLL, das Mantelzelllymphom und Morbus Waldenström^[160].

Idelalisib und Copanlisib sind Inhibitoren der PI3K, einer Kinase, die wie Btk im B-Zell-Rezeptor Signalweg eine zentrale Rolle spielt (s.o.). Idelalisib erhielt bereits die Zulassung für die Behandlung von Patienten mit CLL, SLL und follikulärem Lymphom, Copanlisib befindet sich aktuell noch in klinischer Entwicklung^[161-163].

Die dreifachen Inhibitoren gegen PI3K/mTOR/PIM-1 beziehungsweise PI3K/mTOR/DNA-PK, IBL-301 und LY3023414 zeigen präklinisch bisher gute Wirksamkeit gegen verschiedenste maligne Erkrankungen wie der AML oder des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms^[164]. LY3023414 wird mit NCT02407054 und NCT02443337 aktuell in zwei Phase II Studien an soliden Tumoren evaluiert^[165].

Venetoclax ist ein *first-in-class* oral verfügbarer Inhibitor von Bcl-2, dessen Überexpression in lymphatischen Erkrankungen wie dem follikulären Lymphom oder der CLL zu einer Hemmung der Apoptose führt^[166]. In einer multizentrischen Phase 2 Studie konnte an rezidiert / refraktären Hochrisikopatienten mit CLL eine Ansprechrate von fast 80 % erreicht werden, was zu der Zulassung in den USA 2016 und seit 2017 auch in Europa führte^[167, 177].

2. Ziel der Arbeit

Das Mantelzelllymphom (MCL) macht etwa 6-8 % aller Non-Hodgkin Lymphome aus und wird hauptsächlich durch die Translokation t(11;14) charakterisiert. Hierbei wird das Cyclin D1 Gen CCND1 unter Kontrolle des Immunglobulin Schwere-Kette (IgH)-Gens gestellt, was zur Überexpression von Cyclin D1 führt. Cyclin D1 katalysiert im Komplex mit den Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und 6 die Phosphorylierung und Inaktivierung des Tumorsuppressors Retinoblastom-Protein (Rb). Dadurch wird die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F und die Transkription verschiedener, für den Zellzyklusprogress von der G1-Phase in die S-Phase entscheidender, Proteine ermöglicht. Eine Hemmung der durch die Cyclin D1 Überexpression gesteigerten Zellproliferation stellt damit einen rationalen und auf molekularen pathogenetischen Erkenntnissen beruhenden Ansatz zur Therapie des Mantelzelllymphoms dar. In dieser Arbeit werden die Wirksamkeit und die Auswirkungen des neuen CDK4/6-Inhibitors Abemaciclib an unterschiedlichen MCL Zelllinien, an primären MCL Zellen und an DLBCL Zelllinien auf molekularer Ebene untersucht. Ein besonderer Fokus liegt darüber hinaus auf der Evaluation von Effizienz und Synergismus bei der Kombination von Abemaciclib mit Inhibitoren des B-Zell Rezeptor Signalweges und konventionellen Zytostatika. Es wird gezeigt, dass Abemaciclib ein hoch potenter Zellzyklusinhibitor ohne nennenswerte Toxizität auf die Zellen ist und bei geschickter Kombination synergistische Effekte zur Wirkung von Ibrutinib und Cytarabin erzielen kann.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zellkultur

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Katalognummer</u>
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	L6113
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene™, Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA	5100-0001
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A3672
Ery-Lyse-Puffer ph 7,2	Apotheke Klinikum der Universität München, München, Deutschland	A0001-1
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland	P30-1500
IMDM mit stab. Glutamine, mit 25 mM Hepes, mit 3,024 g/L NaHCO ₃	PANBiotech, Aidenbach, Deutschland	P04-20450
RPMI 1640 mit L-Glutamin, mit 2,0g/L NaHCO ₃	PANBiotech, Aidenbach, Deutschland	P04-16500
TC-Flasche T25, Suspen., Bel. K.	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.3910.502
TC-Flasche T75, Suspen., Bel. K.	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.3911.502
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	T8154

3.1.2. Polimerase Kettenreaktion (PCR)

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Katalognummer</u>
1 % Agarose Gel: Agarose, LE, Analytical Grade	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA	V3125
100 bp DNA ladder	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA	G210

AmpliAq Gold DNA Polymerase	Roche, Mannheim, Germany	L0112-01
Blue/Orange 6x loading dye	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA	G190
dNTP Set (100 mM)	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	10297-018
DPBS mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	14040-166
Ethanol absolute for analysis EMSURE® ACS, ISO, Reag. PhEur	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.00983.1000
GeneAmp® 10X PCR Gold Buffer & MgCl ₂	Applied Biosystems®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	4379874
NucleoSpin® Blood QuickPure (DNA purification kit)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	740569
Rückwärtsprimer: mtReg-R1 ^[178]		Sequenz: 5'-TCG-GAT-ACA-GTT-CAC-TTT-AGC-3'
TAE-Puffer 10x, pH 8,0	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland	T0021
Vorwärtsprimer: mtReg-F1 ^[178]		Sequenz: 5'-TCC-ACC-ATT-AGC-ACC-CAA-AGC-3'

3.1.3. Durchflusszytometrie

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Katalognummer</u>
Ethanol 70%	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland	402815

Natriumcitrat (Trisodium citrate dihydrate)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	S1804
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, USA	559763
Phosphate Buffered Saline (DPBS) ohne Ca ²⁺ , ohne Mg ²⁺	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland	L1825
Propidiumiodid-Lösung	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	P-4864
Rnase A	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	12091-021
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	X100

3.1.4. Western-Blot

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Katalognummer</u>
1,5M Tris (ph 6,8)	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland	T20
1,5M Tris (ph 8,8)	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland	T21
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	8076
Ammonium persulfate (APS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	A3678
Aqua bidest	laboreigene Anlage	
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland	500-0006
Bolt™, LDS Sample Buffer 4x	Novex™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	B0007
Bolt™, Sample Reducing Agent 10x	Novex™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	B0009
Complete Lysis-M, EDTA-free	Roche, Mannheim, Germany	04719964001
Elektrophorese-Puffer 10x	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland	T18

Gel Blotting Paper (Filterpapier)	Whatman, Capitol Scientific, Inc., Austin, Texas, USA	10426890
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	104070
Gel-Transfer-Puffer	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland	T0047-5
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	216763
Isopropanol 70 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	CN09
Luminol sodium salt	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	A4685-5G
Membranen	GE Healthcare, Amersham Hybond- P, Freiburg, Deutschland	RPN 303F
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.06009
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T145
N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	T7024
Natriumazid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	K305
NET 10x ph 7,7	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland	L000999
p-Couramic Acid	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	C9008
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	P5726
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	P0044
Pierce™ ECL Western- Blotting Substrate	ThermoFisher Scientific, Braunschweig, Deutschland	32106

Pre-Diluted Protein Assay Standards: BSA Set	ThermoFisher Scientific, Braunschweig, Deutschland	23208
Protein Marker V	PEQLAB, Erlangen, Deutschland	27-2210
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	3029.1
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	L4509
TBS-Puffer 10x ph 8,0	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland	T03290
Tween® 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	9127

3.1.5. Medium-throughput Assays

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Katalognummer</u>
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA	G7572
WST-1 Cell-Proliferation Reagent	Roche, Mannheim, Deutschland	11 644 807 001

3.1.6. Puffer und Lösungen

<u>Puffer</u>	<u>Zusammensetzung</u>
1,5M Tris (ph 6,8)	908,55 g Tris, zu 5 L mit ger. Wasser aufgefüllt; pH mit HCl eingestellt
1,5M Tris-HCL (ph 8,8)	908,55 g Tris, zu 5 L mit gereinigtem Wasser aufgefüllt; pH mit HCl eingestellt
5% Albumin	5 mg Albumin Fraktion V + 100 mL TBST-Puffer + 1 Spatelspitze Natriumazid
5% Milch	5 mg Milchpulver + 100 mL TBST-Puffer
Einfriermedium	92 % FBS + 8 % DMSO
Elektrophorese-Puffer 10x	151,4 g Tris + 720,65 g Glycin + 50,00 g Natriumdodecylsulfat (SDS-4Na), zu 5 L mit ger. Wasser aufgefüllt

Ery-Lyse-Puffer ph 7,2	8,30 g NH ₄ Cl (155 mM) + 1,00 g KHCO ₃ + 37,00 g Titriplex II (EDTA; 0,13 mM), zu 1 L mit ger. Wasser aufgefüllt
Gel-Transfer-Puffer	15,0 g Tris (0,25 M) + 71,0 g Glycin + 790 g Methanol, zu 5 L mit ger. Wasser aufgefüllt
G-Net	1,25g Gelatine + 50 mL NET 10x + 450 mL Aqua bidest
NET 10x ph 7,7	438,30 g NaCl + 93,60 g Na ₂ -EDTA (Titriplex III) + 302,85 g Tris + 25,00 g Triton X-100, zu 5 L mit ger. Wasser aufgefüllt
PI-Puffer	500 mL Aqua bidest + 40 mL Propidiumiodid + 500 µL Triton X + 500 mg Natriumcitrat, mit NaOH auf ph 8,0 eingestellt
SA	100 mg Luminol + 26,67 mL 1,5 M Tris ph 8,8 + 373,3 mL Aqua bidest
SB	44 mg p-Couramin Acid + 40 mL DMSO
ECL	3 mL SA + 300 µL SB + 0,9 µL H ₂ O ₂
TAE-Puffer 10x pH 8,0	242,30 g Tris + 57,10 mL 100 % Essigsäure + 18,61 g EDTA-2Na-2H ₂ O (Titriplex III), zu 5 L mit ger. Wasser aufgefüllt
TBS-Puffer 10x ph 8,0	60,57 g Tris + 438,30 g NaCl, zu 5 L mit ger. Wasser aufgefüllt
TBST-Puffer	900 mL Aqua bidest + 100 mL TBS-Puffer + 1 mL Tween® 20

3.1.7. SDS-Page Gele

Zusammensetzung	...für 8 % - Gel	...für 10 % - Gel	...für Sammelgel
1,5M Tris (ph 6,8)	-	-	0,8 mL
1,5M Tris (ph 8,8)	7,5 mL	7,5 mL	-
10% APS	0,3 mL	0,3 mL	0,1 mL
10% SDS	0,3 mL	0,3 mL	0,1 mL
Aqua bidest	13,9 mL	11,9 mL	7,25 mL
Rotiphorese® Gel 30	8 mL	10,0 mL	1,7 mL
TEMED	0,018 mL	0,012 mL	0,01 mL

3.1.8. Geräte

Gerät	Hersteller
Blockthermostat BT1302	DITABIS AG, Pforzheim, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
E-BOX VX5	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Elektrophoresekammer Xcell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
ELISA-Reader GloMax® GM3000	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
FUSION-SL Advance	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Laminar-Flow Klasse II Sicherheitswerkbank S-1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl- Genkingen, Deutschland
NanoDrop 1000 Spectrometer	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Vi-Cell™ XR	Beckman Coulter, Brea, Californien, USA
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotanta 46 RC	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Die Mantelzelllymphom Zelllinien (MCL Zelllinien) und die Diffus-großzelliges B-Zell Lymphom Zelllinien (DLBCL Zelllinien) wurden unter Standardbedingungen in Kultur gehalten: Alle Zellen wurden in RPMI 1640 Medium + 10 % fetales Kälber Serum (FBS) (ab hier der Einfachheit halber „RPMI“ genannt) kultiviert (Ausnahme: DB → RPMI 1640 + 20 % FBS) und im Brutschrank bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dreimal wöchentlich geteilt. Ziel war eine Zelldichte von circa 1,5 – 2,5*10⁶ Zellen pro

Milliliter (mL) jeweils vor dem nächsten Teilen. Die Zelldichte und Viabilität wurden mithilfe des Vi-Cell XR (Beckman Coulter) bestimmt. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie wurden die Zellen beim Teilen auf unterschiedliche Konzentrationen gebracht:

- JeKo-1: 2 Tage → $0,35 \cdot 10^6$ Zellen / mL; 3 Tage → $0,15 \cdot 10^6$ Zellen / mL
- Maver-1: 2 Tage → $0,60 \cdot 10^6$ Zellen / mL; 3 Tage → $0,30 \cdot 10^6$ Zellen / mL
- Mino: 2 Tage → $0,55 \cdot 10^6$ Zellen / mL; 3 Tage → $0,30 \cdot 10^6$ Zellen / mL
- Granta 519: 2 Tage → $0,60 \cdot 10^6$ Zellen / mL; 3 Tage → $0,30 \cdot 10^6$ Zellen / mL
- Will-2: 2 Tage → $0,25 \cdot 10^6$ Zellen / mL; 3 Tage → $0,10 \cdot 10^6$ Zellen / mL
- HT: 2 Tage → $0,30 \cdot 10^6$ Zellen / mL; 3 Tage → $0,10 \cdot 10^6$ Zellen / mL
- U-2932: 2 Tage → $0,40 \cdot 10^6$ Zellen / mL; 3 Tage → $0,20 \cdot 10^6$ Zellen / mL
- Hbl-1: 2 Tage → $0,40 \cdot 10^6$ Zellen / mL; 3 Tage → $0,20 \cdot 10^6$ Zellen / mL
- SU-DHL-5: 2 Tage → $0,35 \cdot 10^6$ Zellen / mL; 3 Tage → $0,15 \cdot 10^6$ Zellen / mL
- DB: 2 Tage → $0,40 \cdot 10^6$ Zellen / mL; 3 Tage → $0,20 \cdot 10^6$ Zellen / mL

Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter einer laminar flow Hood unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die mitochondriale DNA (mtDNA) der Zelllinien wurde mittels PCR vervielfältigt und sequenziert, um ihre Echtheit zu bestätigen und Verunreinigungen auszuschließen^[178]. Alle getesteten Zelllinien stimmten mit den Kontrollsequenzen überein (Anhang 1).

3.2.1.1. Auftauen von Zellen

Die eingefrorenen Zellen (1 mL) wurden zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in 10 mL vorgewärmtes (37 °C) RPMI Medium überführt. Anschließend wurden sie abzentrifugiert (1000 rpm, 10 min), der Überstand verworfen und das Pellet in 10 mL neuem RPMI Medium gelöst. Die aufgetauten Zellen wurden in eine Zellkulturflasche (TC-Flasche T25) überführt.

3.2.1.2. Einfrieren von Zellen

Circa $2 \cdot 10^7$ Zellen wurden bei 1000 rpm und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 2 mL kaltem Einfriermedium gelöst und je 1 mL davon in zwei Einfriertubes überführt. Die fertigen Proben wurden bei -80 °C in einem Cryo 1°C freezing Container eingefroren.

3.2.1.3. Zellzählung und Viabilität

Trypanblau wurde bereits 1904 von Paul Ehrlich und Kollegen als Chemotherapeutikum gegen die Trypanosomenerkrankung entwickelt^[179, 180]. Es wird von einer intakten

Zellmembran zurückgehalten, eine zerstörte oder poröse Zellmembran wie etwa bei toten oder apoptotischen Zellen lässt Trypanblau in die Zelle eindringen. Lässt sich die Zelle anfärben, liegt also ein Zellmembranschaden vor. Dadurch lassen sich indirekt Rückschlüsse auf die Viabilität einer Population ziehen: Der Prozentsatz der nicht angefärbten Zellen spiegelt den Anteil der lebendigen Zellen wider^[181].

Die Bestimmung der Zellzahl sowie Viabilität durch trypanblau Färbung wurde in dieser Arbeit fast ausschließlich mit dem Vi-Cell XR (Beckman Coulter) durchgeführt. Dafür wurden die Suspensionszellen gut gemischt und 500 – 600 µL der Suspension in einen Vi-Cell Cup gegeben. Das Vi-Cell färbt die Zellen an und wertet digital 50 bis 100 Bilder einer „fiktiven“ Zählkammer aus. Hierbei wurden die Zellgröße analysiert sowie die viablen und nicht viablen Zellen gezählt^[182]. Die viablen Zellen wurden in Prozent als Teil der Gesamtzellzahl angegeben.

3.2.2. PCR

Die mtDNA wurde nach dem NucleoSpin Blood QuickPure-Protokoll extrahiert^[183]: Zuerst wurde der elution Puffer BE auf 70 °C vorgeheizt. 10^6 - 10^7 Zellen in Suspension wurden zentrifugiert (300 g_n, 10 min) und in 200 µL DPBS gelöst. In einem 1,5 mL Eppendorf Tube wurden die gelösten Zellen mit 200 µL lysis Puffer BQ1 und 25 µL Proteinase K gemischt, gründlich gevortext und bei 70 °C in einem Heizblock inkubiert. Nach 10 Minuten Inkubation wurden 200 µL Ethanol hinzugefügt und noch einmal gevortext. Die Proben wurden nun zum Binden der DNA je in ein NucleoSpin Blood QuickPure Column mit Sammeltube geladen und bei 11000 g_n für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde das Column in ein neues Sammelrohr gegeben und 350 µL des Wash-Puffers BQ2 hinzugegeben. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (11000 g_n, 3 min). Zum Schluss wurden 50 µL des vorgewärmten BE Puffers hinzugegeben, die Proben bei Raumtemperatur eine Minute inkubiert und schließlich ein letztes Mal zentrifugiert (11000 g_n, 1 min). Zur Messung der Menge extrahierter mtDNA wurde das NanoDrop Spectrometer von PEQLAB benutzt. Für die Blank-Messung nutzten wir BE-Puffer.

PCR: Es wurden je 100 ng / µL mtDNA verwendet. Dazu wurden 11,05 µL eines PCR Mastermixes mit der benötigten Menge mtDNA gemischt und mit Aqua bidest auf 25 µL aufgefüllt. Anschließend wurden 7 µL Primer hinzugegeben, alles gevortext und kurz zentrifugiert. Der PCR Mastermix wurde hergestellt aus:

- 2,5 µL 10-fach ATG Puffer,
- 2,5 µL dNTPs (2,5 mM),

- 2,5 µL MgCl₂ (25 mM),
- 1,25 µL DMSO und
- 0,3 µL AmpliTaqGold Polymerase.

Die fertigen Proben wurden nun amplifiziert (GeneAmp PCR System): Aktivierung 95 °C für 10 Minuten, dann folgen 35 Zyklen Denaturierung (30 Sekunden, 94 °C), Primer Hybridisierung (1 Minute, 58 °C) und Elongation (1 Minute, 72 °C). Abschließend 72 °C für weitere 7 Minuten. Die fertig amplifizierten Proben wurden zum Sequenzieren an Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Deutschland) geschickt.

Gelelektrophorese: 500 mg 1 % Agarose Gel wurden in 50 mL TAE-Puffer gelöst und für etwa 5 bis 10 Minuten in der Mikrowelle erhitzt bis die Lösung klar und blasenlos wurde. Die Lösung wurde in die Elektrophoresekammer gegeben. Nach Festigung wurde die Kammer mit TAE-Puffer aufgefüllt und es wurden je 5 µL der 100 bp Ladder mit 1 µL loading Dye, sowie 10 µL der Probe mit 2 µL loading Dye geladen. Die Elektrophorese wurde bei 121 Volt durchgeführt. Die fertig aufgetrennte mtDNA wurde unter UV-Licht in der E-BOX VX5 fotografiert.

3.2.3. Durchflusszytometrie

3.2.3.1. Zellzyklusanalyse

Zur Zellzyklusanalyse wurden die Zellen mit Propidium Iodid (PI) angefärbt. PI interkaliert in die DNA der Zelle und färbt diese proportional zum DNA-Gehalt an^[184, 185]. Die Anfärbung wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen und das Ergebnis anhand eines Histogramms ausgewertet: Auf der y-Achse wurde die Anzahl an gezählten Zellen, auf der x-Achse die Stärke des Signals abgebildet. Ein doppelt so starkes Signal steht für doppelten DNA-Gehalt und spricht damit für eine Zelle in G2- oder M-Phase^[186].

Zur Probenvorbereitung wurden je nach Zelldichte 0,6 bis 1,2 mL Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit 2000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgegossen und einmal mit je 1,5 mL PBS gewaschen (2000 rpm, 5 min, 4 °C). Dann wurden die Zellen in je 1 mL gekühltem 70 % Ethanol gelöst, kurz gevortext und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen für mindestens 24 Stunden bei – 20 °C gelagert. Zur Messung wurden die Zellen einige Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen und anschließend bei 2000 rpm, 21 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, die Zellen noch zweimal mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen (2000 rpm, 5 min) und je 50µL RNase und 200µL PI-Puffer dazu gegeben. Die Proben wurden zeitnah mittels FACSCalibur gemessen.

Die Auswertung der Daten wurde mithilfe des Programms FlowJo Version 7.6.5 durchgeführt. Zur Berechnung der Phasenverteilung wurde das Watson Modell (pragmatisch) benutzt, das keinerlei Annahmen zur S-Phasenverteilung macht, sondern sich exakt der Messungen anpasst^[187, 188].

3.2.3.2. Zelltodanalyse

Die relative Zunahme toter beziehungsweise apoptotischer Zellen nach Behandlung mit einem Therapeutikum oder einer Kombination verschiedener Therapeutika wurde mit dem PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I bestimmt. Die Zellen wurden hierbei doppelt mit Annexin V und 7AAD gefärbt. Dieses Kit beruht darauf, dass es in frühem Stadium der Apoptose zu einer Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran an die Außenseite kommt, wodurch die Zelle von Makrophagen erkannt und phagozytiert wird^[189]. Annexin V bindet Phosphatidylserin Ca^{2+} -abhängig und kann damit Zellen schon in frühen Stadien der Apoptose identifizieren, selbst bei noch intakter Zellmembran^[190]. 7-Aminoactinomycin D (7AAD) hingegen ist ein Molekül mit sehr großem Molekulargewicht, das mit starker Affinität an die GC-Regionen der DNA bindet^[191]. Aufgrund seiner Größe und Affinität kann angenommen werden, dass 7AAD in geringen Konzentrationen die Zellmembran nicht passieren kann und so nur an DNA von Zellen ohne intakte Membran bindet^[192, 193]. Daraus lässt sich schließen, dass die Doppelfärbung von Zellen mit PE Annexin V und 7AAD eine effektive Methode ist Zellen, die in frühem Stadium apoptotisch sind (Annexin V positiv, 7AAD negativ) von bereits toten Zellen mit nicht mehr intakter Zellmembran zu unterscheiden (Annexin V positiv, 7AAD positiv)^[190, 194].

Zur Durchführung wurden 0,6 mL Zellsuspension nach 24, 48 oder 72 Stunden in ein FACS-Röhrchen gegeben und bei 1500 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen (je 1500 rpm, 5 min). Währenddessen wurde der 10-fach Annexin V binding Puffer im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. 100 μL des verdünnten binding Puffers und je 5 μL PE Annexin V und 7AAD wurden zu jeder Probe hinzugegeben. Außerdem wurden pro Zelllinie Einzelfärbungen der unbehandelten Kontrolle mit PE Annexin und 7AAD durchgeführt. Nach 15-minütiger Inkubation im Dunklen wurden weitere 400 μL binding Puffer hinzugegeben und die Proben innerhalb einer Stunde am FACSCalibur gemessen. Ausgewertet wurden die erhobenen Daten auch hier mit dem Programm FlowJo Version 7.6.5.

3.2.4. Western-Blot

Zur Bestimmung der Expression von Schlüsselproteinen in der Pathogenese des Mantelzelllymphoms wurden Western-Blot Analysen durchgeführt.

Proteinextraktion:

Zur Proteinextraktion aus Zytoplasma und Nucleus wurde das cOmplete™ Lysis-M EDTA-free Kit benutzt. Hierfür wurden circa 2×10^6 Zellen oder 2 mL Zellsuspension in ein Eppendorf Tube gegeben, via trypanblau Färbung im Vi-Cell XR gezählt und bei $2500 g_n$ 10 Minuten lang zentrifugiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Proben soweit möglich immer auf Eis gehalten. Der Überstand wurde abpipettiert und pro 10^6 Zellen wurden 100 μ L Lysis-M Reagenz hinzugegeben (Lysis-M Reagenz: 1 Tablette cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets in 10 mL Lysis-M Reagent; dazu Phosphataseinhibitor-Cocktail 2 und 3 je im Verhältnis 1:100). Die Proben wurden anschließend für 10 Minuten bei circa 300 rpm und Raumtemperatur geschüttelt. Zuletzt wurden die gelösten Proteine von restlichen Zelltrümmern und –fragmenten durch Zentrifugation bei $14000 g_n$, 15 Minuten getrennt und der Überstand in ein neues Eppendorf Tube überführt. Die fertigen Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

Zur Messung der Proteinkonzentration in den Lysaten wurde der Bio-Rad Protein Assay verwendet, bei dem der Effekt, dass Coomassie Brilliant Blue G-250 bei Proteinbindung seine Farbe von rot zu blau ändert, ausgenutzt wird^[195]. Das Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bradford Reagenz) wurde im Verhältnis 1:5 mit zweifach destilliertem Wasser verdünnt. In einer 96-Well Platte wurden je Well 200 μ L der verdünnten Bradford Reagenz mit 5 μ L des Proteinlysates oder des Proteinstandards gemischt, 10 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 600 nm Absorption mit dem GloMax gemessen.

Gelelektrophorese, Blotting und Chemilumineszenzmessung verschiedener Antikörper:

Die Western-Blots wurden nach laboreigenem Protokoll hergestellt. Die Gele wurden in fertigen Plastikkassetten gegossen. Trenn- und Sammelgele wurden in gewünschter Dichte (meist 10 %) nach obenstehender Liste gegossen. APS und TEMED wurden erst zum Schluss dazu gegeben, um die Polymerisation der Gele vor dem Gießen zu verhindern. Nach der Zugabe von APS und TEMED zum Trenngel wurde die Mischung kräftig geschüttelt, gevortext, in die Kammern gegossen und mit 70 % Isopropanol übergossen. Nach 30 Minuten wurde das Isopropanol abgegossen, die Kassetten zwei bis drei Mal mit destilliertem Wasser gespült, mit Filterpapier getrocknet und APS und TEMED wurden zum Sammelgel dazu gegeben. Nach kräftigem Schütteln und Vortexen wurde das Sammelgel in die Kammern gegeben und die Käme (meist 15 Wells) eingesetzt. Nach weiteren 30 Minuten konnten die Gele in feuchtes

Papier und Frischhaltefolie gewickelt gelagert und im Kühlschrank bis zu zwei Tage aufgehoben werden.

Denaturierung der Proteine:

5 – 10 µg Protein, 4-fach loading Dye und 10-fach reducing Agent wurden mit zweifach destilliertem Wasser auf 20 µL je Well aufgefüllt, gevortext und für 10 Minuten bei 70 °C denaturiert. Danach wurden die Proteinproben kurz auf Eis abgekühlt, einige Sekunden zentrifugiert um etwaige Luftblasen zu entfernen und 10 µL des Protein Marker V sowie je 18,3 µL der Proben in die verschiedenen Slots gefüllt. Die Elektrophorese wurde in Xcell SureLock™ Elektrophoresekammern mit Runningpuffer (1:10 mit destilliertem Wasser verdünnter 10x-Elektrophoresepuffer) durchgeführt: 61 V, 30 Minuten; 81 V, 90 min.; 121 V bis zum Ende der Elektrophorese. Gebloftet wurde das Gel in der Trans-Blot® SD Semi-Dry transfer Cell. Hierfür wurden die beschrifteten Membranen nacheinander kurz in Methanol, zweifach destilliertes Wasser und Gel-transfer Puffer getaucht. Zwischen je drei Filterpapierstreifen wurden zuerst die Membranen und dann die Gele in die Transferzelle gelegt und mit Gel-transfer Puffer übergossen. Die Gele wurden von oben nach unten mit 0,25 A für 2 bis 2,5 h, niemals jedoch über 25 V, gebloftet. Anschließend wurden die Membranen für 1 h in 5 % Milch geblockt und drei Mal 10 Minuten lang in TBST gewaschen. Der primäre Antikörper wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Detektion der Chemilumineszenz:

Nach Inkubation des primären Antikörpers wurde die Membran drei Mal für je 10 Minuten in TBST gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper 60 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurde die Membran noch 3x gewaschen. Es wurden je 2-5 mL einer Antikörperverdünnung genutzt. Alle primären Antikörper mit Ausnahme von GAPDH und β-Actin wurden in 5 % Albumin Fraktion V gelöst; sekundäre Antikörper wurden in 5 % Milch gelöst. GAPDH und β-Actin wurden in G-Net gelöst. Die Chemilumineszenz wurde entweder mit eigens hergestelltem ECL (s.o.) oder dem Pierce™ ECL Western-Blotting Substrate am FUSION SL ADVANCE, Programm FusionCapt Advance Solo 4 16.11 aufgenommen und ausgewertet.

3.2.5. Medium-throughput Assays

3.2.5.1. *WST-1: Zellproliferations-Reagenz*

4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate (WST-1) ist ein Tetrazoliumsals, das in Anwesenheit von NADH und NADPH^[196] einen wasserlöslichen Formazanfarbstoff^[197] erzeugt. Diese Reaktion ist in der Spanne von circa 1000-50000 Zellen

pro Well linear, nicht toxisch und lässt mit gewissen Einschränkungen auf die Anzahl der Zellen in Kultur schließen^[198, 199].

Der Zellproliferations-Assay wurde modifiziert nach Herstellerprotokoll durchgeführt^[200]: In einer 96-Well Platte wurden pro Well 100 µL Zellsuspension und 10 µL WST-Reagenz verwendet. Außerdem wurden 6 Wells pro Platte mit 100 µL Medium und 10 µL WST-Reagenz als Blank vorbereitet. Danach wurde die Platte für 2,5 h lichtgeschützt inkubiert (37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ in Inkubator). Anschließend wurde die Platte 1 Minute auf einem Shaker vorsichtig geschüttelt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Gemessen wurde die Absorption bei 450 nm, Referenzabsorption 600 nm.

3.2.5.2. *CellTiter-Glo: Zellviabilitäts Assay*

Der CellTiter-Glo Assay ist ein Fluoreszenz Assay, der den ATP-Gehalt der Zellen misst und damit indirekt auch Rückschlüsse auf die Zellzahl zulässt^[201]. Die Reaktion [Beetle Luciferin + ATP + O₂ → Oxyluciferin + AMP + CO₂ + Licht] wird katalysiert durch die Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase + Mg²⁺^[202]. Da der totale ATP-Gehalt gemessen wird, ist es unerheblich in welchem Stadium sich die Zellen befinden und ob sie metabolisch aktiv sind^[203], auch wenn unter bestimmten Bedingungen stimulierte Zellen einen höheren ATP-Gehalt besitzen können^[201].

Die Fluoreszenzmessung wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt^[202]: In einer 96-Well Platte wurden je 12000 (un-)behandelte Zellen in 100 µL pro Well angesetzt (bei sehr hoch proliferativen Zelllinien wie der Will-2 10000 Zellen in 100 µL) und je nach Versuchsaufbau für 24-48 h inkubiert. Die randständigen Wells wurden mit 100-200 µL Medium befüllt, um die inneren Wells vor Verdunstung zu schützen. Außerdem wurden pro Platte 6 Wells mit 100 µL Medium als Blank angesetzt.

Nach Inkubation wurde die Platte aus dem Brutschrank genommen und circa 20-30 Minuten lang lichtgeschützt bei Raumtemperatur abgekühlt. Das CellTiter-Glo Reagenz wurde 1:4 mit zweifach destilliertem Wasser verdünnt und ebenfalls auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurden 100 µL der CellTiter-Glo Reagenz mit einer Mehrkanalpipette zügig in jeden zu messenden Well pipettiert, die Platte 2 Minuten lichtgeschützt vorsichtig auf einem Shaker geschüttelt und dann 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Zum Schluss wurde mit dem GloMax die Lumineszenz inklusive Blank gemessen.

Wash-out Versuche: Da der G1-Arrest nach 24 h am höchsten war (vgl. [Abbildung 9](#), [Abbildung 10](#)), inkubierten wir die MCL Zellen zuerst über 24 h mit 31,25 nM Abemaciclib. Anschließend wurde Abemaciclib den Zellen wieder entzogen (Wash-out): Die Zellen wurden

zweimal gewaschen (je 10 Min, 300 g_n bei Raumtemperatur in RPMI) und der Überstand anschließend abgeschüttet. Das Pellet wurde in 5 mL neuem Medium gelöst. Nach 8 h wurden in einer 96-Well Platte je 12000 Zellen pro Well angesetzt und mit unterschiedlichen Dosen Cytarabin oder Ibrutinib behandelt. Nach weiteren 24 h wurde der ATP-Gehalt der Zellen mittels CellTiter-Glo gemessen. Parallel wurde der gleiche Ansatz ohne den Wash-out nach 24 h durchgeführt (s. [Abbildung 2](#) und [3](#))

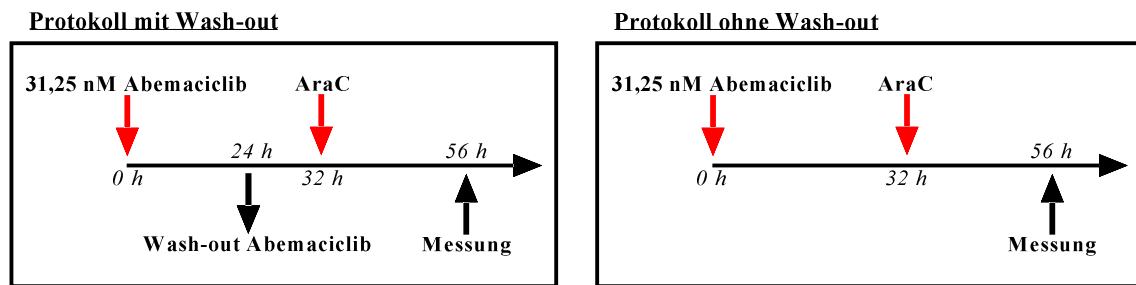


Abbildung 2: Versuchsaufbau „Wash-out“ am Beispiel Abemaciclib / Cytarabin. Versuche mit und ohne Wash-out wurden immer parallel durchgeführt. Inkubation mit Abemaciclib in 6-Well Platten mit je 5 mL Zellsuspension pro Well. Nach 32 h Überführung in 96-Well Platte zur Inkubation mit Cytarabin oder Ibrutinib. Messung mittels CellTiter-Glo weitere 24 h später.

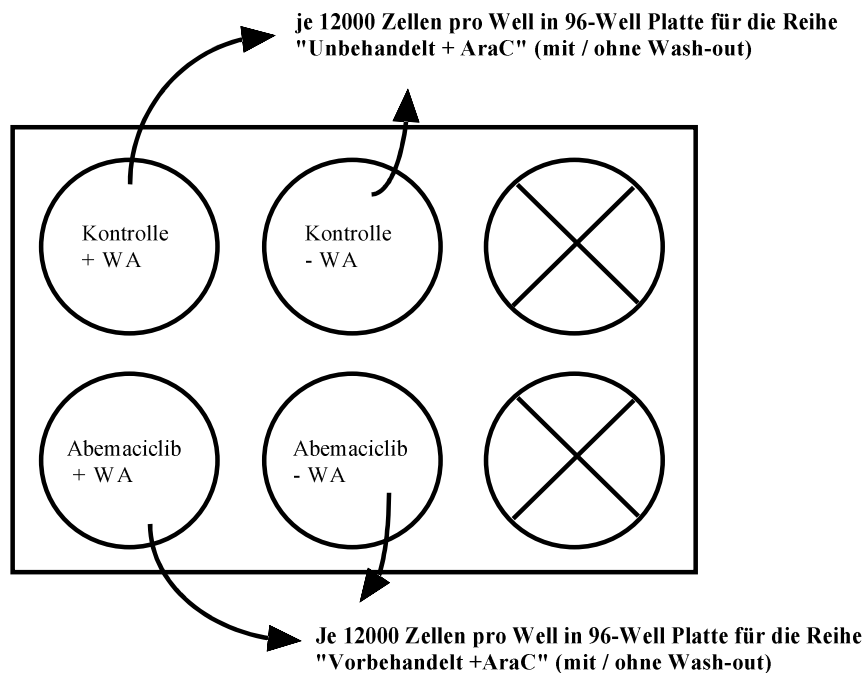


Abbildung 3: Schema einer 6-Well Platte bei den Wash-out Versuchen vor Verteilung der Zellen in die 96-Well Platte und vor Behandlung am Beispiel Cytarabin. + WA = mit Wash-out; - WA = ohne Wash-out. Die Zellen jedes Wells der 6-Well Platte wurden mittels Vi-Cell XR gezählt und anschließend auf die Konzentration 240000 Zellen / mL verdünnt. Um 12000 Zellen pro Well zu erhalten wurden anschließend 50 µL der Zellsuspension mit 50 µL in Medium gelöstem AraC verdünnt.

Kombination Abemaciclib und weitere Inhibitoren des BCR Signalweges: Für die Kombinationen mit Idelalisib, Copanlisib und IBL-301 wurden die Zellen mit 31,25 nM Abemaciclib für 24 h vorbehandelt und anschließend mit den verschiedenen Substanzen für 24

h in einer 96-Well Platte inkubiert. Venetoclax und LY3023414 wurden simultan mit 31,25 nM Abemaciclib kombiniert und der ATP-Gehalt wurde nach 48 h gemessen. Die verwendeten Konzentrationen waren 0,25 μ M, 1 μ M und 4 μ M für Idelalisib und Copanlisib sowie 0,025 μ M, 0,1 μ M und 0,4 μ M für IBL-301. Die Konzentrationen von LY3023414 und Venetoclax lagen je bei 0,0625 μ M, 0,25 μ M, 1 μ M und 4 μ M.

3.2.6. Gewinnung von Lymphozyten aus Primärmaterial und Kombinationsversuche mit primären Zellen

Es wurde ein abgewandeltes Herstellerprotokoll verwendet^[204]: Nach Blutentnahme wurden 15 mL Vollblut mit 15 mL RPMI 1640 in einem 50 mL Falcon Röhrchen verdünnt. 15 mL Biocoll separating Solution wurde in einem neuen Falcon Röhrchen vorgelegt und mit dem verdünnten Vollblut vorsichtig überschichtet. Anschließend wurde alles bei 900 g_n 20 Minuten lang vorsichtig zentrifugiert (Beschleunigung und Bremse auf niedrigster Stufe), der so entstandene „Buffy Coat“ langsam abpipettiert und in ein neues 50 mL Falcon Röhrchen überführt. Dieses wurde mit RPMI 1640 aufgefüllt und für 10 Minuten bei 300 g_n und 4 °C zentrifugiert (Bremse und Beschleunigung auf höchster Stufe). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet wurde mithilfe von 5 mL Erylysepuffer aufgelöst und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Falcon Röhrchen wieder mit RPMI 1640 aufgefüllt und 5 Minuten lang bei 300 g_n und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Falcon Röhrchen ein weiteres Mal mit RPMI 1640 aufgefüllt und 10 Minuten lang bei 300 g_n und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand ein letztes Mal verworfen. Zum Schluss wurde das Pellet mit 2 mL IMDM aufgelöst. Die Zelldichte wurde in der Verdünnung 1/100 im Vi-Cell XR bestimmt.

Für die anschließenden Versuche wurde in den 96-Well Platten eine Konzentration von 50000 primären Zellen pro Well gewählt. Die Lymphozyten des gesunden Probanden wurden in einer 96-Well Platte für 72 h mit Abemaciclib (31,25; 62,5; 125; 250; 500 nM), Ibrutinib (0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 μ M) oder Cytarabin (62,5; 125; 250; 500; 1000 nM) alleine sowie in der Kombination 62,5 nM Abemaciclib mit Ibrutinib (0,625 – 10 μ M) oder Cytarabin (62,5 – 1000 nM) behandelt und anschließend mittels CellTiter-Glo gemessen. Die Zellen von Patient 1 und 2 wurden mit 31,25 nM Abemaciclib und 250 nM Ibrutinib alleine oder in Kombination behandelt. Die Zellen von Patient 2 wurden außerdem mit aufsteigenden Konzentrationen von Cytarabin mit und ohne vorhergehendem Abemaciclib Wash-out behandelt.

3.2.7. Statistik

3.2.7.1. Berechnung von Synergismus und Antagonismus

Zur Berechnung des Effekts der Kombinationen verschiedener Substanzen wurde der combination Index mithilfe des fractional Product (FP) nach Webb (1963) berechnet, in dem der vorhergesagte Effekt zweier einzelner Inhibitoren mit dem tatsächlich gemessenen Wert verglichen wird. Dabei gilt:

$$CI = (1 - a_{Komb.}) - (1 - a_1 * a_2)$$

wobei a die fractional Activity darstellt (entspricht der Ratio zur Kontrolle). Anhand dessen wird entschieden, ob ein Synergismus ($CI > 0$), ein Antagonismus ($CI < 0$) oder eine Summation / additiver Effekt ($CI = 0$) vorliegt. Um kleine Abweichungen mit zu berücksichtigen, wählten wir für additive Effekte $CI = 0; +/- 0,1$ ^[205].

3.2.7.2. Statistische Auswertung

Sofern p-Werte angegeben sind wurde bei der statistischen Analyse ein ungepaarter t-Test mit Welch-correction durchgeführt. Der D'Agostino & Pearson omnibus normality Test wurde zur Bestätigung der Normalverteilung der Daten durchgeführt. Eine logarithmische Transformation der Daten wurde vor dem t-Test bei den Versuchen in Triplikaten durchgeführt, bei denen eine Normalverteilung angenommen werden kann, die aber ein zu geringes n für einen D'Agostino & Pearson omnibus normality Test haben.

Zur Statistischen Auswertung der Western-Blots wurden die wichtigsten Proteine mittels FusionCapt Advance quantifiziert. Hierfür wurde das Signalvolumen der Banden ausgemessen, in Verhältnis zum Signalvolumen der Ladekontrolle gesetzt und anschließend eine Ratio zur unbehandelten Kontrolle gebildet. Es wurde jeweils die Proteinexpression der behandelten Zelllinien mit der Proteinexpression der unbehandelten Zellen verglichen. Wegen fehlender Gaußscher Verteilung der Daten wurde der Mann-Whitney Test^[206] gewählt, um Veränderungen in den Proteinkonzentrationen zu entdecken. Um gegen multiples Testen zu kontrollieren, wurde eine multivariate Analyse der Daten mittels Kruskal-Wallis Test^[207] und anschließendem post-Test (Dunn's Multiple Comparison Test^[208]) durchgeführt. In den Kruskal-Wallis Test wurden alle Daten eines Proteins für alle getesteten Zelllinien eingeschlossen (Kontrolle, Abemaciclib, Ibrutinib und Abemaciclib plus Ibrutinib je zum Zeitpunkt 8 beziehungsweise 24 h). Beim angeschlossenen post-Test wurden jeweils die verschiedenen Behandlungsarme gegen die Kontrolle getestet.

Zur Durchführung aller statistischen Tests wurde das Programm GraphPad Prism Version 6.01 verwendet. Ergebnisse mit $p < 0,05$ werden als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Zellzählung und FACS: Starke Wachstumsinhibition ohne Einfluss auf Viabilität oder Apoptose bei Behandlung mit Abemaciclib

Der Zellzyklusinhibitor Abemaciclib wurde an Zelllinien und primären Zellen des Mantelzelllymphoms sowie an Zelllinien des Diffus-großzelligen B-Zell Lymphoms untersucht. CDK4/6-Inhibition stellt einen rationalen Therapieansatz des Mantelzelllymphoms dar, da die Translokation t(11;14) und damit einhergehend die Cyclin D1 Überexpression einen wesentlichen Teil der Pathogenese darstellen^[14, 209]. Das Diffus-großzellige B-Zell Lymphom stellt die häufigste, auf molekularer Ebene jedoch sehr heterogene Gruppe an Non-Hodgkin Lymphomen dar. Hier kommt es vor allem beim ABC-Typ zu Deletionen im CDKN2A und B Gen und damit zum Wegfall eines wichtigen CDK4/6-Inhibitors^[8, 210].

Als erstes wurden für den CDK4/6-Inhibitor die IC₅₀-Konzentrationen der verschiedenen zu testenden Zelllinien ermittelt (Abbildung 4). Damit sollte ein erster Eindruck der Potenz des Inhibitors gewonnen werden. Die Zelllinien wurden aufsteigenden Konzentrationen des Inhibitors ausgesetzt und nach 24, 48 und 72 h wurden die Viabilität und die Zelldichte mittels Vi-Cell XR ermittelt. Die Wirkung des Inhibitors zeigte sich in der trypanblau Färbung am deutlichsten nach 72 h. Drei von vier der getesteten MCL Zelllinien und eine DLBCL Zelllinie reagierten sensibel: Bei 62,5 nM Abemaciclib zeigte sich eine Verringerung der Anzahl viabler Zellen von Mino, JeKo-1 und Maver-1 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf jeweils 35,2 (SD 3), 39,5 (SD 3) und 40,0 (SD 6) %, bei Will-2 betrug die Anzahl viabler Zellen nach 72 h bei der behandelten Population sogar nur noch 16,3 (SD 1) %. Die restlichen DLBCL Zelllinien (HT, SU-DHL-4 und 5, Hbl-1, U2932 und DB) sowie die MCL Zelllinie Granta 519 waren weniger sensibel, es ließ sich eine Wachstumsinhibition lediglich auf Werte zwischen 70 und 89 % im Vergleich zur Kontrolle erreichen (Abbildung 6). Interessanterweise blieb die Viabilität jedoch bei allen Zelllinien selbst unter hohen Dosen konstant. Bei keiner getesteten Zellpopulation fiel die Viabilität 72 h nach 62,5 nM Abemaciclib unter 99 % der unbehandelten Kontrollpopulation (Abbildung 7). Der Effekt von Abemaciclib beruhte somit eher auf einer zytostatischen Hemmung der Zellproliferation als auf direkter toxischer Zellschädigung. Diese Annahme konnte visuell verdeutlicht werden, indem die Zellzahlen zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 h ins Verhältnis zur Zellzahl zum Zeitpunkt der Abemaciclib-Behandlung (0 h) gesetzt wurden. Es ergab sich dabei eine invers konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der Zahl viabler Zellen, ohne Abnahme der behandelten Population (Abbildung 8).

Dosis-Effekt Kurven von je drei DLBCL und MCL Zelllinien:

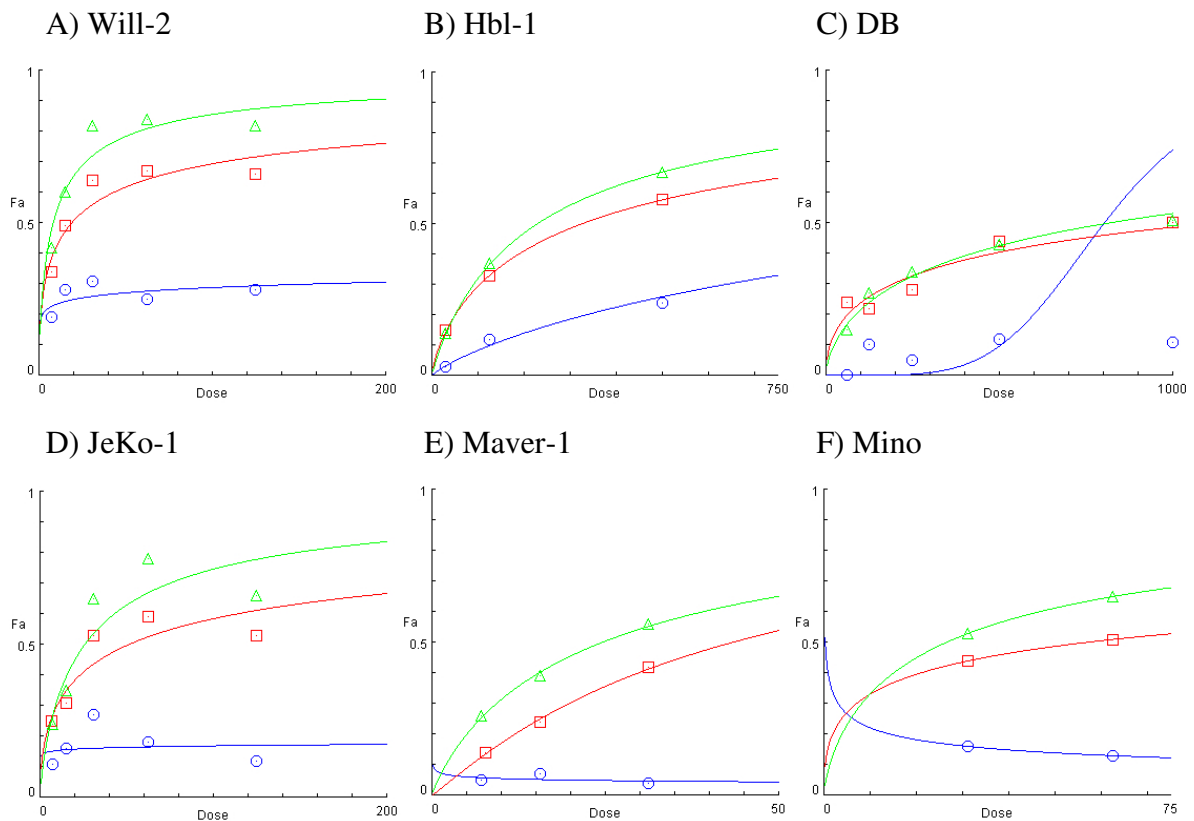


Abbildung 4: Dosis-Effekt Kurven, berechnet mit CompuSyn^[201]. Die Zellen wurden aufsteigenden Konzentrationen von Abemaciclib ausgesetzt und anschließend mittels trypanblau Färbung im Vi-Cell XR gezählt. Dosisangaben in [nM]. Kurven für je drei Zeitpunkte: Blau - 24 h; Rot - 48 h; Grün - 72 h. Es wurde deutlich, dass der stärkste Effekt von Abemaciclib nach 72 h zu beobachten war. Daten zeigen Mittelwert von Triplikaten, je mind. zwei unabhängige Passagen.

Die IC₅₀-Werte aus den Dosis-Effekt Kurven sind in Tabelle 3 noch einmal zusammengefasst:

IC-50-Values	24 h	48 h	72 h
<i>Will-2</i>	1,50E+05	18,83	8,17
<i>Hbl-1</i>	1,74E+03	323,97	227,85
<i>DB</i>	802,40	1120,88	815,34
<i>JeKo-1</i>	1,49E+16	51,10	25,71
<i>Maver-1</i>	3,72E-08	43,28	24,50
<i>Mino</i>	0,27	56,63	26,45

Tabelle 3: IC₅₀-Konzentrationen, berechnet mit CompuSyn aus demselben Datensatz. Die Daten nach 24 h waren nicht sehr aussagekräftig, da bei keiner Zelllinie zu diesem Zeitpunkt ein ausreichender Effekt messbar war (siehe Abbildung 4).

Es zeigte sich demnach eine zeit- und konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition mit dem stärksten Effekt nach 72 h in allen getesteten Zelllinien (Abbildung 4). Anhand Abbildung 5 lässt sich ab 31,25 nM ein Plateau erkennen.

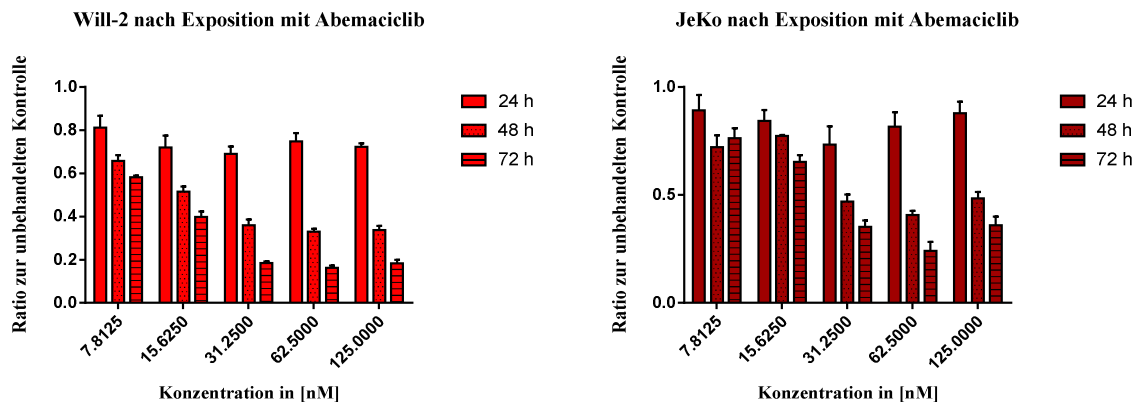


Abbildung 5: Will-2 und JeKo-1 behandelt mit 7,8125 – 125 nM Abemaciclib. Zellzahl gemessen mittels trypanblau Färbung nach 24, 48 und 72 h. Aufgetragen ist das Verhältnis der viable behandelten Zellen zur Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt. Es zeigte sich eine zeit- und konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition. Stärkster Effekt nach 72 h. Ab ca. 31,25 nM schien sich ein Plateau zu bilden. Triplikate nach mind. zwei unabhängigen Passagen, Fehlerbalken zeigen SD.

Anhand dieser Daten wählten wir für die folgenden Experimente die Konzentrationen 31,25 und 62,5 nM für alle MCL Zelllinien und 62,5 beziehungsweise 125 nM für die im Großen und Ganzen etwas weniger sensitiven DLBCL Zelllinien. Diese Konzentrationen liegen bei den auf CDK4/6-Inhibition sensibel reagierenden Zelllinien Will-2, JeKo-1, Maver-1 und Mino allesamt über der jeweils berechneten IC₅₀-Konzentration nach 72 h. Sie sind jedoch noch gering genug, um unspezifische Effekte so gut es geht auszuschließen^[158]. Damit sollte durch gleiche Versuchskonzentrationen bei allen Zelllinien größtmögliche Vergleichbarkeit bei einer möglichst niedrigen Dosierung erreicht werden.

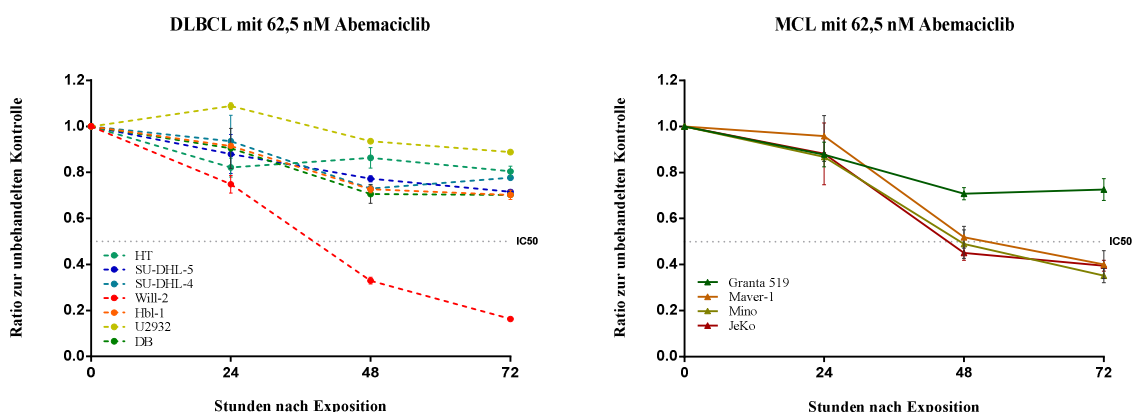
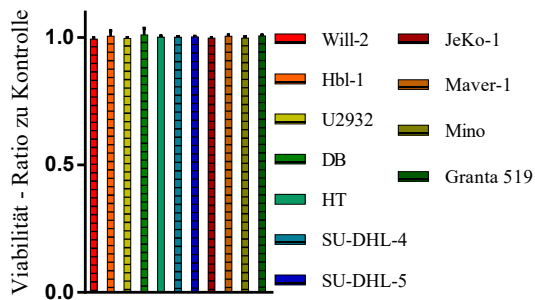


Abbildung 6: DLBCL und MCL Zelllinien behandelt mit 62,5 nM Abemaciclib. Trypanblau Färbung (Vi-Cell XR) nach 24, 48 und 72 h. Aufgetragen ist das Verhältnis der behandelten viable Zellen zu den unbehandelten viable Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt. Nur bei Will-2 wurde in der Gruppe der DLBCL die IC₅₀-Konzentration überschritten. Beim MCL waren 62,5 nM Abemaciclib bei 3 von 4 Zelllinien (Maver-1, Mino, JeKo-1) ausreichend, um die IC₅₀ nach 48 oder 72 h zu überschreiten. Triplikate nach mind. zwei unabhängigen Passagen, Fehlerbalken zeigen SD.

A) Zelllinien nach 72 h Inkubation mit 62,5 nM abemaciclib



B) Will-2 nach 72 h Inkubation mit abemaciclib

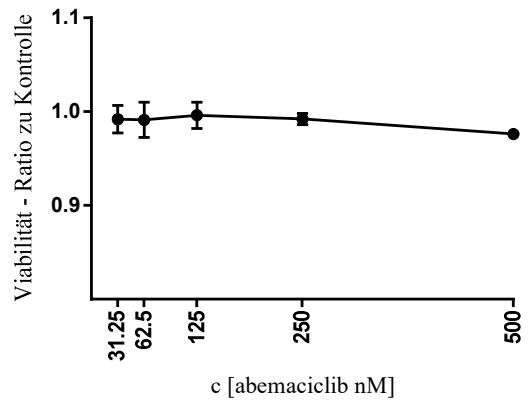


Abbildung 7: Viabilität gemessen anhand trypanblau Färbung (Vi-Cell XR). A) Die Viabilität der mit 62,5 nM Abemaciclib behandelten Zellen unterschied sich in keiner der Zelllinien wesentlich von der Viabilität der jeweiligen Kontrollpopulationen. B) Auch bei steigenden Konzentrationen bis 500 nM blieb die Viabilität unverändert, hier zu sehen am Beispiel der sehr sensitiven Zelllinie Will-2. Triplikate nach mind. zwei unabhängigen Passagen, Fehlerbalken zeigen SD.

JeKo-1 Behandelt mit Abemaciclib

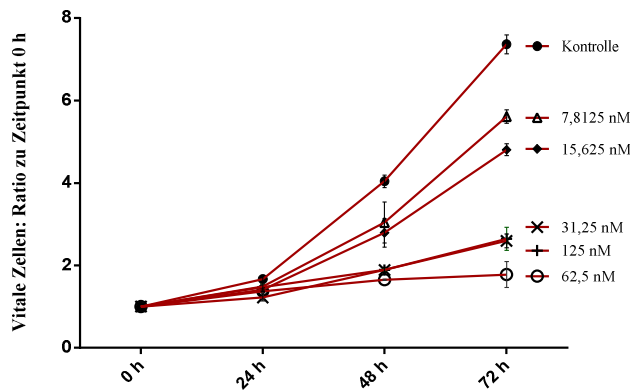
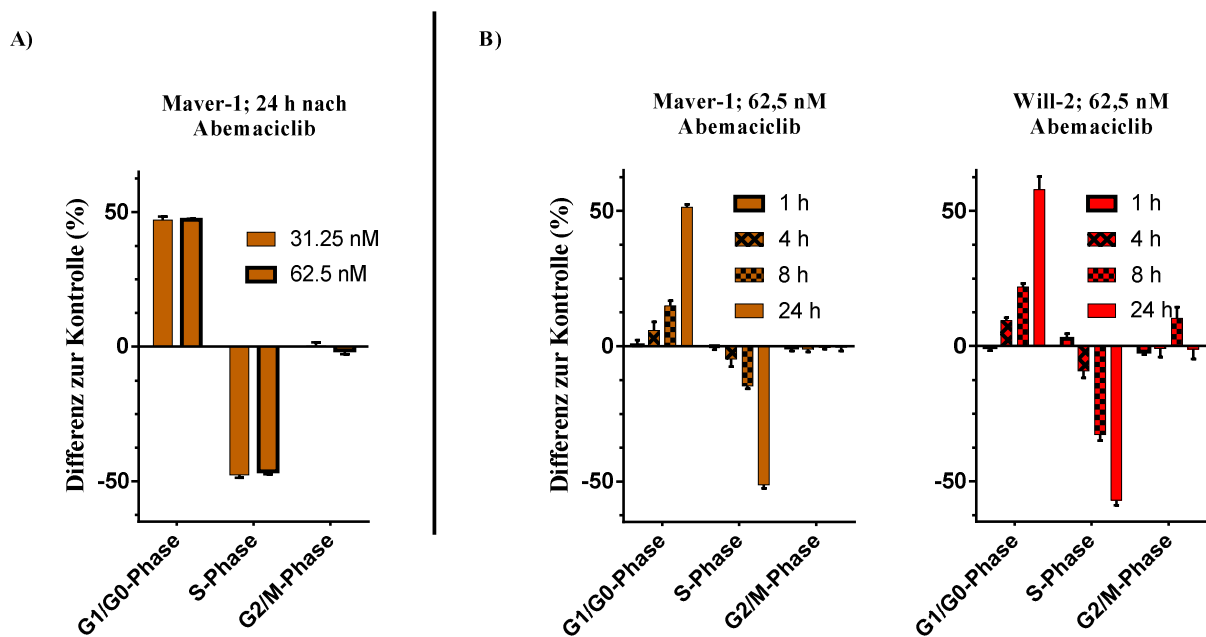


Abbildung 8: JeKo-1 Zellen behandelt mit aufsteigenden Konzentrationen Abemaciclib, trypanblau Färbung (Vi-Cell XR). Aufgetragen ist das Verhältnis viabler Zellen zum Ausgangswert (Zeitpunkt der Abemaciclibbehandlung, 0 h). Triplikate nach mind. zwei unabhängigen Passagen, Fehlerbalken zeigen SD.

Abemaciclib ist ein potenter Zellzyklusinhibitor ohne Einfluss auf Zelltod oder Apoptose:

Inhibition der CDK4 und 6 führt zum Zellzyklusarrest in der G1- beziehungsweise G0-Phase^[211]. Darüber hinaus deuteten die Ergebnisse aus den trypanblau Färbungen bereits an, dass Abemaciclib wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Viabilität der behandelten Zellen habe. Um die Auswirkungen von Abemaciclib auf den Zellzyklus und Apoptose der MCL und DLBCL Zellen besser zu verstehen, wurden mittels PI-Färbung und Annexin V / 7AAD-Doppelfärbungen durchflusszytometrische Analysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inkubation mit Abemaciclib durchgeführt. Bei der Zellzyklusanalyse zeigte sich in den sensitiven Zelllinien JeKo-1, Maver-1, Mino (MCL) und Will-2 (DLBCL) ein fast vollständiger G1-Arrest bei niedrigen Konzentrationen: Nach 24 h 62,5 nM Abemaciclib ruhten 86,58 (SD

3,02); 84,41 (SD 0,92) und 91,8 (SD 0,48) % der JeKo-1; Maver-1 und Mino Zellen und 87,72 (SD 2,16) % der Will-2 Zellen in der G1-Phase. Zusätzlich schien der G1-Arrest zumindest teilweise reversibel zu sein: Die Zunahme der Zellen in G1-Phase im Vergleich zur Kontrolle nach Behandlung mit 62,5 nM Abemaciclib stieg bei Maver-1 beispielsweise von +5,8 (SD 3,2) % (4 h) über +15 (SD 1,9) % (8 h) auf +50,3 (SD 1,1) % bis zum Zeitpunkt 24 h stetig an und nahm anschließend wieder sukzessive ab auf +21,5 (SD 2,8) % zum Zeitpunkt 72 h (Abbildung 9, Abbildung 10).



C) Zellzyklus 24 h nach Behandlung mit Abemaciclib

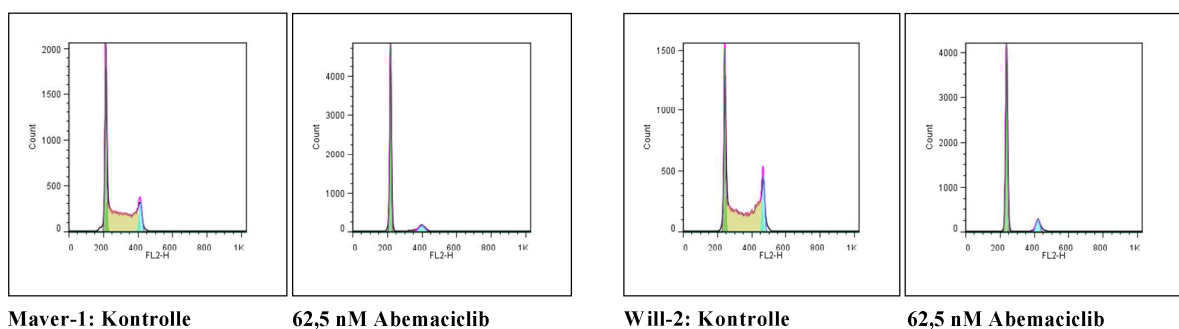


Abbildung 9: Zellzyklusanalyse mittels PI-Färbung (Durchflusszytometrie). A) Auswirkungen auf den Zellzyklus der Zelllinie Maver-1 bei 31,25 und 62,5 nM Abemaciclib nach 24 h Inkubation. In beiden Konzentrationen wurde ein fast vollständiger G1-Arrest erreicht. B) Zunahme des G1-Arrests innerhalb der ersten 24 h nach Behandlung mit Abemaciclib, Maximum nach 24 h. C) Vier repräsentative Histogramme: Maver-1 und Will-2 je Kontrolle und behandelt mit 62,5 nM Abemaciclib nach 24 h Inkubation. Grün: Anzahl der Zellen mit einfachem Chromosomensatz (G1- oder G0-Phase). Hellblau: Zellen mit doppeltem Chromosomensatz (G2-Phase). Gelb: Zellen in S-Phase. Sowohl bei Maver-1 als auch bei Will-2 ließen sich eine Depletion der Zellen in S-Phase beobachten. Triplikate nach mind. zwei unabhängigen Passagen, Fehlerbalken zeigen SD.

Sensitive Zelllinien behandelt mit 62.5 nM Abemaciclib

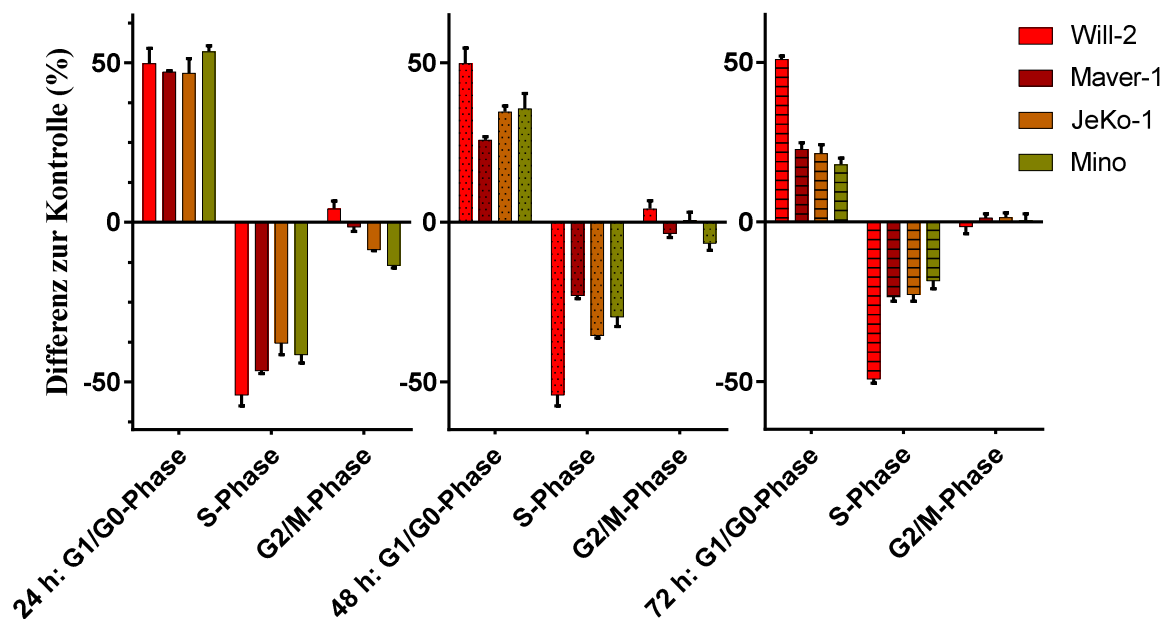


Abbildung 10: Zellzyklusanalyse mittels PI-Färbung (Durchflusszytometrie) der sensitiven MCL (Maver-1, JeKo-1, Mino) und DLBCL (Will-2) Zelllinien. Es war eine deutliche Zunahme der G1-Phase mit der damit einhergehenden Abnahme der S-Phase in den behandelten Populationen im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen (G1-Arrest). Der Effekt war am stärksten nach 24 h ausgeprägt und anschließend rückläufig. Triplikate nach mind. zwei unabhängigen Passagen, Fehlerbalken zeigen SD.

Im Gegensatz zu den sensitiven Zellen zeigten die Zelllinien, bei denen in der Zellzählung der Effekt Abemaciclibs eingeschränkt war, auch in der Zellzyklusanalyse nur ein sehr geringes Ansprechen. Bei der MCL Zelllinie Granta 519 ließ sich mit einer Zunahme der Zellen in G1-Phase nach 24 h Behandlung um +30,2 (SD 1,5) % und einer Abnahme an Zellen in der S-Phase um immerhin -26,2 (SD 2,3) % noch am Ehesten ein leichtes Ansprechen erreichen. Die in der trypanblau Färbung resistenten DLBCL Zelllinien zeigten noch geringere Sensitivität mit einer Zunahme an G1-Phase Zellen bei DB um +18,5 (SD 0,6) % sowie bei den Zelllinien Hbl-1 und U2932 um lediglich +6,5 (SD 0,8) % und +3,5 (SD 2,9) % unter Therapie.

Der wachstumshemmende Effekt auf die Zellen konnte also durch einen potenten, Abemaciclib induzierten G1-Arrest erklärt werden. Demgegenüber war analog zu den Ergebnissen der trypanblau Färbung (s. [Abbildung 7](#)) selbst bei den sensiblen Zelllinien fast keine Zunahme frühapoptotischer oder apoptotischer beziehungsweise toter Zellen unter Behandlung mit Abemaciclib nachweisbar.

Resistente Zelllinien behandelt mit 62.5 nM Abemaciclib

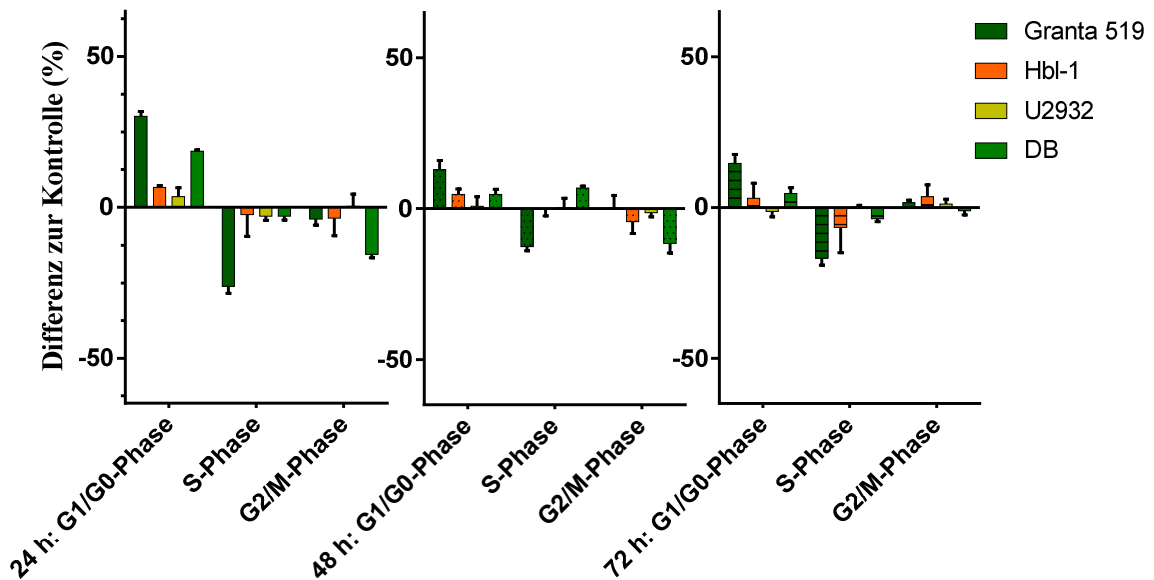


Abbildung 11: Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie der resistenten MCL (Granta 519) und DLBCL (Hbl-1, U2932, DB) Zelllinien. Es war eine deutlich geringere Zunahme der G1-Phase im Vergleich zur Kontrolle in allen vier Zelllinien zu erkennen. Der Effekt war auch hier am stärksten ausgeprägt nach 24 h und anschließend rückläufig. Triplikate nach mind. zwei unabhängigen Passagen, Fehlerbalken zeigen SD.

Alle getesteten Zelllinien zeigten analoge Ergebnisse (Tabelle 4): Selbst nach 72 h konnte im Vergleich zur Kontrollpopulation keine bedeutende Zunahme der Zellen in Frühapoptose (Quadrant Q3, Abbildung 12) oder Apoptose / Zelltod (Quadrant Q2, Abbildung 12) beobachtet werden. Mino zeigte mit einer Abnahme der sterbenden Zellen um -18% und einer damit einhergehenden relativen Zunahme der Lebenden Zellen um $+19\%$ im Vergleich zur Kontrolle sogar einen paradoxen Effekt. Dies ist interessant, da protektive Effekte einer Behandlung besonders bei der Zelllinie Mino bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurden, beispielsweise für die Kombination Ibrutinib und Sotrastaurin (eines Proteinkinase C Inhibitors). In diesem Falle wurde die Protektion auf eine durch Ibrutinib leicht erhöhte Phosphorylierung und Aktivierung von Akt zurückgeführt^[212]. Abemaciclib führt in der Zelllinie Mino zu keiner Änderung der Phosphorylierung von Akt und in anderen Zelllinien eher zu einer Dephosphorylierung (vgl. Tabelle 12), weshalb diese Erklärung mit großer Wahrscheinlichkeit nicht übernommen werden kann. Die Annahme, dass Inhibition der CDK4/6 durch Abemaciclib nicht toxisch auf die behandelten Zellen wirkte, wurde jedoch durch diese Beobachtungen weiter gestützt (Abbildung 12).

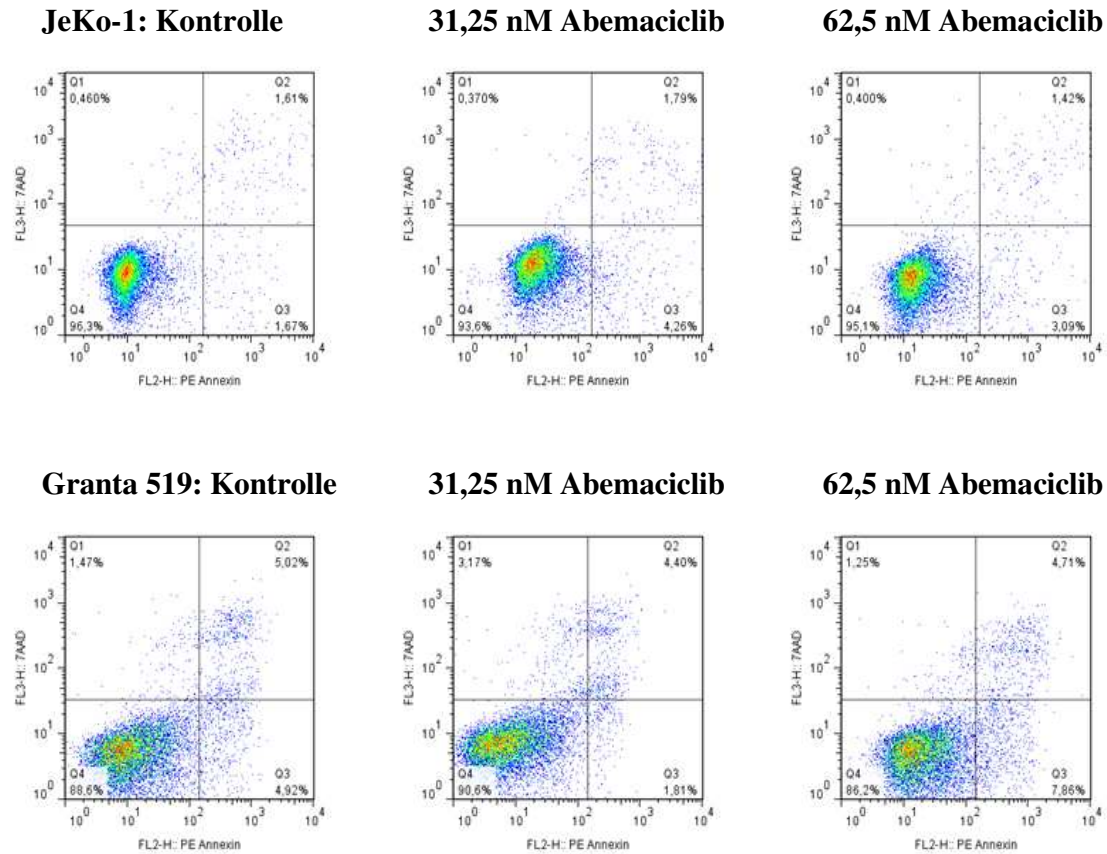


Abbildung 12: Zelltodanalyse mittels Annexin V / 7AAD-Färbung (Durchflusszytometrie) nach 72 h Inkubation mit 31,25 bzw. 62,5 nM Abemaciclib. Repräsentatives Beispiel einer sensiblen und einer resistenten MCL Zelllinie (JeKo-1, Granta 519). Doppelt negative Zellen (Q4) waren lebende, gesunde Zellen. Annexin V + / 7AAD - Zellen (Q3) konnten als frühapoptotische Zellen, Annexin V + / 7AAD + Zellen (Q2) als apoptotische beziehungsweise tote Zellen betrachtet werden^[194]. Zellen in Q1 stellten Zelltrümmer dar. Weder bei der sensiblen noch der resistenten Zelllinie ließ sich eine wesentliche Änderung nach Therapie beobachten. Repräsentativ für die Ergebnisse aus Triplikaten, mind. zwei unabhängige Passagen.

A) <u>Zelltod bei 62,5 nM</u>		JeKo-1		Maver-1		Mino		Granta 519	
		<i>MW</i>	<i>SD</i>	<i>MW</i>	<i>SD</i>	<i>MW</i>	<i>SD</i>	<i>MW</i>	<i>SD</i>
<u>Abemaciclib (MCL)</u>									
Tot (Q2 + Q3)	48 h	+2,03	0,19	+0,87	1,22	-4,29	2,89	+1,50	1,85
Lebend (Q4)		-2,00	0,30	-0,93	1,19	+4,6	2,62	-4,77	2,35
Tot (Q2 + Q3)	72 h	+2,4	1,02	+2,91	1,04	-18,41	2,09	+2,60	2,86
Lebend (Q4)		-1,9	0,61	-3,37	1,27	+19,07	2,29	-2,20	2,51
B) <u>Zelltod bei 62,5 nM</u>									
<u>Abemaciclib (DLBCL)</u>		Will-2		Hbl-1		U2932		DB	
		<i>MW</i>	<i>SD</i>	<i>MW</i>	<i>SD</i>	<i>MW</i>	<i>SD</i>	<i>MW</i>	<i>SD</i>
Tot (Q2 + Q3)	48 h	+8,23	1,20	+4,26	5,27	+0,79	0,45	+1,22	2,81
Lebend (Q4)		-8,30	1,06	-4,43	4,75	-0,43	0,90	-1,63	2,38
Tot (Q2 + Q3)	72 h	+10,47	11,21	+1,06	1,05	-0,16	0,99	+3,43	4,19

Lebend (Q4)		-12,93	14,30	-1,10	0,95	+0,23	1,34	-3,37	4,03
--------------------	--	--------	-------	-------	------	-------	------	-------	------

Tabelle 4: Zelltodanalyse mittels Annexin V / 7AAD-Färbung (Durchflusszytometrie). Differenz der prozentualen Anzahl lebender, apoptotischer und frühapoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrollpopulation unter Abemaciclibbehandlung. MW = Mittelwert; Triplikate nach mind. zwei unabhängigen Passagen, Fehlerbalken zeigen SD.

4.2. Medikamentenkombinationen können zu Verstärkung oder Abschwächung der beteiligten Pharmaka führen

„Opportunities for potent metabolic depression with two inhibitors often occur when the metabolism involves two pathways.“ schrieb Webb im Jahr 1963 ([205], S.500). Mit dem Ziel Resistenzen vorzubeugen und die therapeutische Dosierung zytotoxischer Medikamente sowie deren Nebenwirkungen zu reduzieren sind Medikamentenkombinationen auch in der Therapie maligner Erkrankungen von enormem Interesse^[213].

4.2.1. Abemaciclib und Ibrutinib

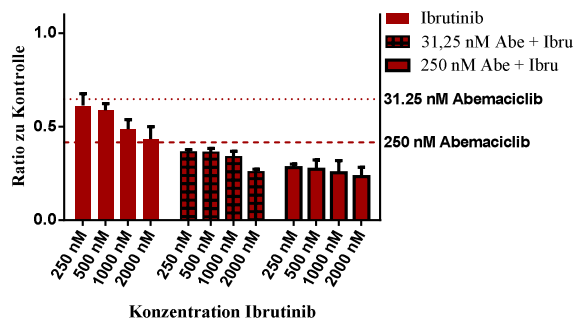
Der Btk-Inhibitor Ibrutinib wird bereits sehr erfolgreich in der Therapie des Mantelzelllymphoms eingesetzt^[6] und es gibt präklinische Daten, die auf eine synergistische Wirkung der kombinierten Btk- und CDK4/6-Inhibition hindeuten^[214]. Bei den vorrangegangenen Versuchen wurde deutlich, dass bereits bei einer Konzentration von 31,25 nM ein effizienter G1-Arrest durch Abemaciclib ohne nennenswerte Toxizität erzielt werden kann. Für die folgenden Versuche wählten wir diese Konzentration für Abemaciclib, da wir davon ausgingen, dass damit bei den sensiblen Zelllinien der maximale spezifische Effekt Abemaciclibs bereits erreicht sei (s.o.). Zusätzlich wählten wir eine höhere Konzentration (250 nM), um etwaige unspezifische Effekte ausschließen oder aufzeigen zu können.

Es wurde deutlich, dass Ibrutinib *in vitro* durchschnittliche Aktivität in etwas höheren Dosen aufweist. Wird Ibrutinib mit dem CDK4/6-Inhibitor Abemaciclib simultan kombiniert, so zeigen sich überwiegend additive Effekte in allen sensiblen Zelllinien sowie ein Antagonismus bei Granta 519 (Abbildung 13, Tabelle 5). Lediglich die Kombination 31,25 nM Abemaciclib mit 1000 nM Ibrutinib zeigte mit CIs von je 0,1 einen Synergismus bei Maver-1 und Will-2. Die Zelllinie Granta 519 ist weder gegenüber Ibrutinib noch Abemaciclib (s.o.) empfindlich. Dementsprechend sollten die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung bei dieser Zelllinie nur sehr zurückhaltend interpretiert werden. Um den Einfluss der zwei verschiedenen Abemaciclib Konzentrationen zu untersuchen, verglichen wir anschließend die CI-Werte von 31,25 nM Abemaciclib / Ibrutinib mit den Werten für 250 nM Abemaciclib / Ibrutinib. Dabei fiel auf, dass sich die Werte zusammen genommen statistisch signifikant voneinander unterschieden:

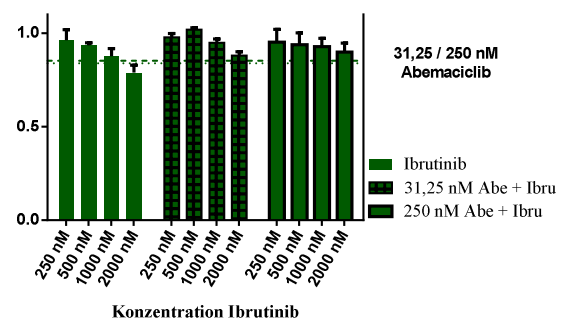
Die Werte für 31,25 nM, ausgenommen der Daten für Granta 519, lagen eher im positiven Bereich zwischen 0 und 0,1, bei 250 nM Abemaciclib eher im negativen Bereich zwischen -0,1 und 0 (Mittelwerte: 0,03; SD: 0,06 und -0,03; SD: 0,03; $p=0,0013$).

In einem zweiten Ansatz führten wir vor der Behandlung mit Ibrutinib eine Vorbehandlung der Zellen mit 31,25 nM Abemaciclib über 32 h durch. So wurde ein suffizienter G1-Arrest in den Zellen zum Zeitpunkt der Behandlung mit Ibrutinib erreicht (vgl. [Abbildung 9](#)). Hierbei zeigten sich anders als bei der gleichzeitigen Behandlung teilweise stark synergistische Effekte mit *combination Indices* bei JeKo-1 von 0,19 für 2,5 μ M Ibrutinib und Maver-1 von 0,24 und 0,39 für jeweilig 2,5 und 5 μ M Ibrutinib ([Abbildung 14](#), [Tabelle 6](#)).

A) JeKo-1 Behandelt mit Abemaciclib und Ibrutinib



B) Granta 519 Behandelt mit Abemaciclib und Ibrutinib



[Abbildung 13](#): Messung des ATP-Gehalts behandelter Zellen (CellTiter-Glo) nach 48 h Inkubation. Zellen behandelt mit 31,25 und 250 nM Abemaciclib sowie mit aufsteigenden Konzentrationen Ibrutinib. Hier zeigten sich additive Effekte in den meisten Zelllinien, jedoch nicht in der Zelllinie Granta 519 ([Tabelle 5](#)). Graphen Beispielhaft für die sensible Zelllinie JeKo-1 (A) und die resistente Zelllinie Granta 519 (B). Technische Triplikate mit SD.

31,25 nM Abe	JeKo-1	Maver-1	Mino	Granta 519	Will-2
250 nM Ibru	0,03	0,00	-0,01	-0,17	0,02
500 nM Ibru	0,02	0,04	-0,05	-0,23	0,08
1000 nM Ibru	-0,02	0,1	0,04	-0,21	0,10
2000 nM Ibru	0,02	0,09	-0,09	-0,22	0,09
250 nM Abe	JeKo-1	Maver-1	Mino	Granta 519	Will-2
250 nM Ibru	-0,03	-0,01	-0,04	-0,13	-0,05
500 nM Ibru	-0,03	0,01	-0,02	-0,14	-0,01
1000 nM Ibru	-0,05	-0,08	-0,01	-0,18	0,02
2000 nM Ibru	-0,05	-0,04	-0,08	-0,23	0,01

[Tabelle 5](#): Zusammenfassung der *combination Indices* (CI) aller getesteten Zelllinien. Berechnung des CI aus den in [Abbildung 13](#) gezeigten Daten und den Daten der restlichen Zelllinien nach Messung des ATP-Gehalts (CellTiter-Glo). Werte zwischen -0,1 und 0,1 wurden als unabhängige Medikamenteneffekte, also additiv, gewertet (gelb). Werte unter -1 wurden als Antagonismus (rot) und Werte über 1 als Synergismus (grün) gewertet.

Sequentielle Behandlung von MCL Zelllinien mit 31,25 nM Abemaciclib und 0,625 - 5 μ M Ibrutinib

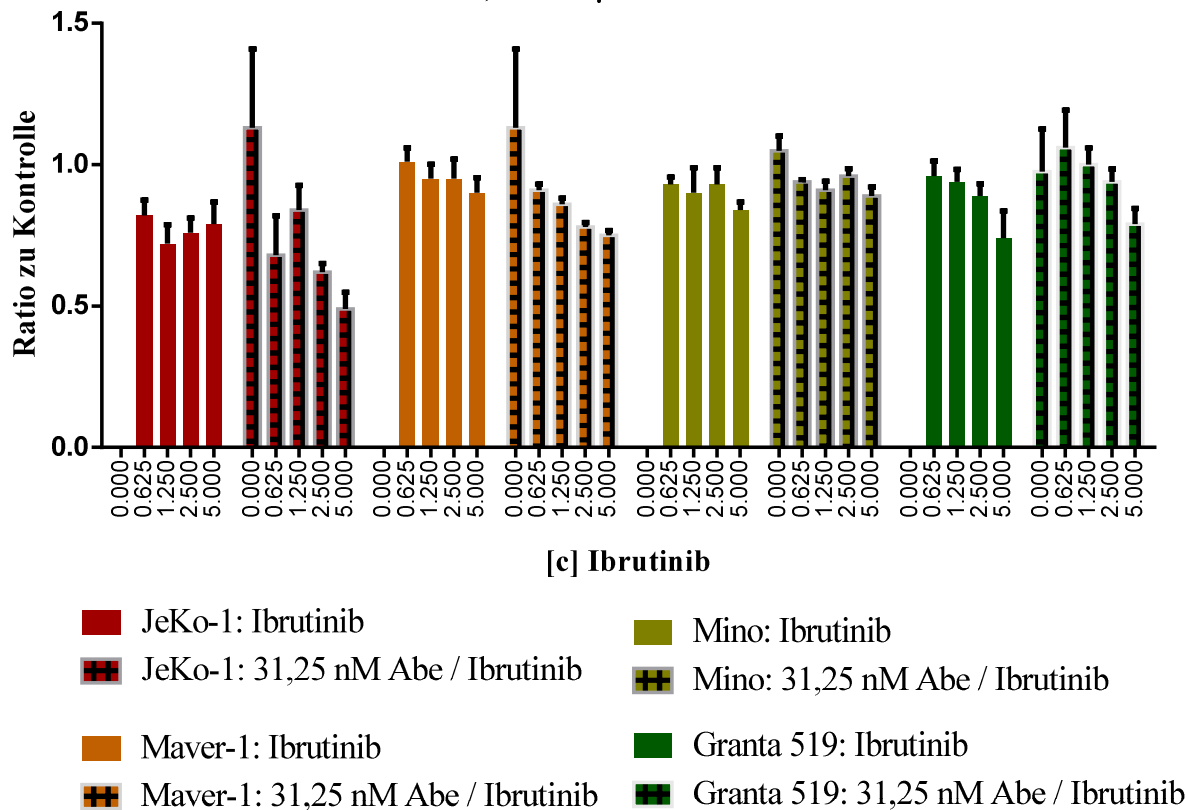


Abbildung 14: Sequentielle Behandlung von MCL Zellen mit Abemaciclib und Ibrutinib. Nach 32 h Inkubation mit 31,25 nM Abemaciclib in 6-Well Platten wurden die behandelten Zellen in einer 96-Well Platte mit Ibrutinib in aufsteigenden Konzentrationen (0,625 – 5 μ M) inkubiert. 24 h später wurde der ATP-Gehalt mittels CellTiter-Glo gemessen. Gezeigt sind jeweils die Ratio zu un behandelter Kontrolle von Zellen die allein mit Ibrutinib behandelt wurden (kein Muster) und von Zellen die für 32 h mit Abemaciclib und anschließend 24 h mit Ibrutinib behandelt wurden. Man konnte vor allem bei den Zelllinien JeKo-1 und Maver-1 bei der Kombination beider Substanzen einen stärkeren Effekt feststellen als bei Ibrutinib- oder Abemaciclib-Einzelterapie. Technische Triplikate mit SD.

Konzentration Ibrutinib:	0,625 μ M	1,25 μ M	2,5 μ M	5 μ M
CI JeKo-1	0,25	-0,03	0,24	0,39
CI Maver-1	0,13	0,11	0,19	0,18
CI Mino	0,04	0,04	0,02	-0,01
CI Granta 519	-0,12	-0,08	-0,06	-0,07
CI Will-2	0,01	0,06	0,01	-0,01

Tabelle 6: Zusammenfassung der CIs aller getesteten Zelllinien berechnet u.a. anhand der in [Abbildung 14](#) gezeigten Daten. Bei JeKo-1 und Maver-1 ließ sich ein deutlicher Synergismus erkennen, bei den anderen Zelllinien additive Effekte.

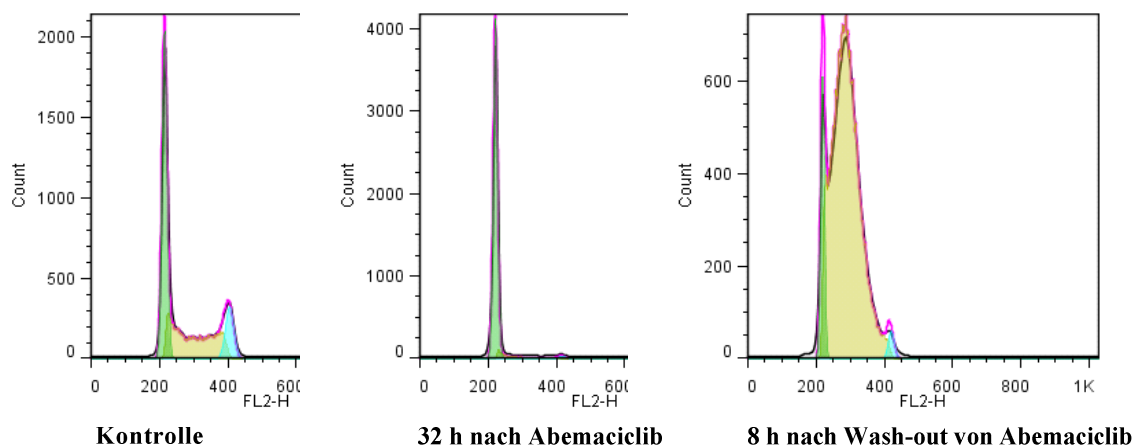
Die Ergebnisse der gleichzeitig durchgeführten Versuchsreihe Ibrutinib nach Abemaciclib Wash-out konnten keine Systematik erkennen lassen und werden hier nicht weiter besprochen.

4.2.2. Abemaciclib und Cytarabin

Die Arbeitsgruppe um Yang *et al.* konnte zeigen, dass bei akuter myeloischer Leukämie durch den CDK4/6-Inhibitor Palbociclib eine starke Potenzierung der Cytarabin (AraC)-

Wirkung durch die Synchronisation der Zellen in der S-Phase sowohl in Zellkultur als auch im Maus-Modell erzielt werden kann^[215]. In Anlehnung daran wollten wir herausfinden, ob sich ähnliche Effekte auch beim Mantelzelllymphom erreichen lassen. Zuerst sollten hierbei durch einen Abemaciclib-vermittelten G1-Arrest alle Zellen in derselben Zellzyklusphase synchronisiert werden. Nach Entzug des Inhibitors sollten aufgrund der postulierten Reversibilität des G1-Arrests (vgl. Abbildung 10) alle Zellen synchron von der G1- in die S-Phase übertreten. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Behandlung mit Cytarabin, eines Pyrimidin-Analogons, das als Antimetabolit die DNA-Synthese hemmt^[216, 217] und dadurch vor allem auf sich teilende, also auf sich in der S-Phase befindende Zellen wirkt^[218]. Dadurch sollte die Cytarabin-Sensitivität der Zellen zu erhöht werden.

Durchflusszytometrie (PI-Färbung): Mino Zellzyklus



Durchflusszytometrie (PI-Färbung): JeKo-1 Zellzyklus

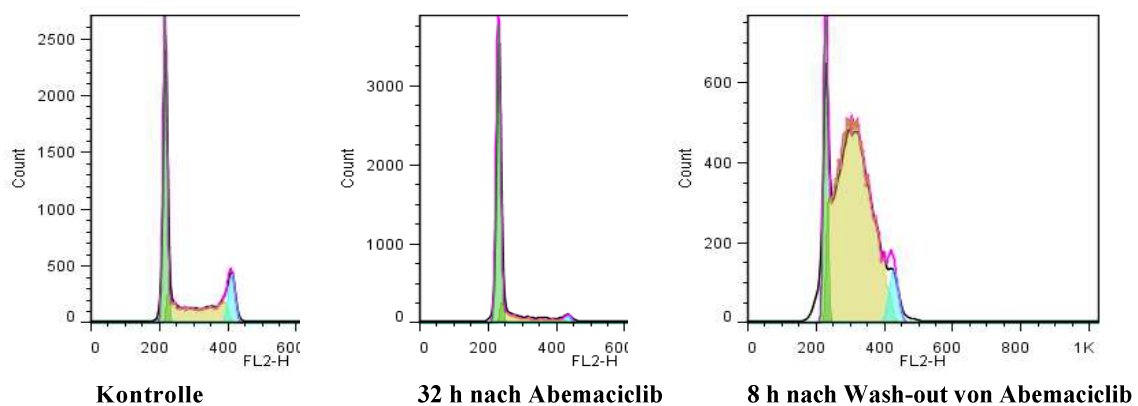


Abbildung 15: Zellzyklusanalyse mittels PI-Färbung (Durchflusszytometrie) bei Mino und JeKo-1. Grün: G1/G0-Phase, Gelb: S-Phase, Blau: G2/M-Phase. Behandlung mit 31,25 nM Abemaciclib. In der Population, die mit Abemaciclib vorbehandelt und anschließend einem Wash-out unterzogen wurde, zeigte sich bei beiden Zelllinien ein starker Anstieg der Zellen in S-Phase. Im Gegensatz dazu ruhten die Zellen, die dem Wash-out nicht unterzogen wurden wie bereits in Kapitel 4.1 gezeigt weiterhin in G1-Phase. Repräsentative Beispiele aus Triplikaten, mind. zwei unabhängige Passagen.

A) Zellzyklus JeKo-1 und Will-2: 4 - 8 h nach Wash-out

B) Zellzyklus Mino: 8 - 24 h nach Wash-out

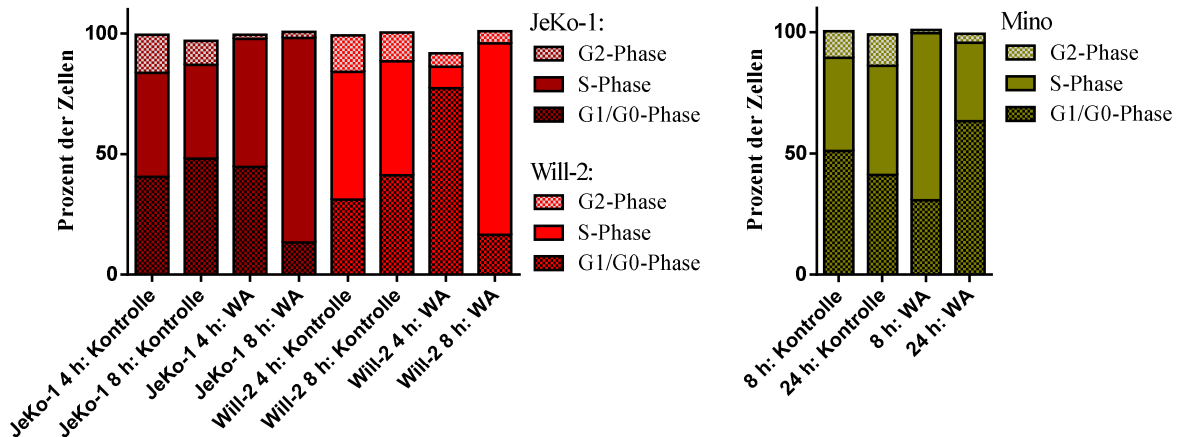


Abbildung 16: Zellzyklusanalyse mittels PI-Färbung (Durchflusszytometrie) zu den Zeitpunkten 4 und 8 h (A) und 8 und 24 h (B). Es wurde deutlich, dass die stärkste S-Phase Synchronisation nach 8 h stattfand.

In allen Zelllinien ließ sich eine deutliche S-Phase Synchronisation durch Abemaciclib Wash-out herbeiführen. 8 h nach Wash-out lagen 88 % (+ 50 %, SD 2,0 %) der Mino, 83 % (+ 45 %, SD 1,2 %) der JeKo-1, 65 % (+16 %) der Maver-1, 71 % (+ 16 %) der Granta 519 und 79 % (+ 32 %) der Will-2 Zellen in S-Phase vor (Abbildung 15). Durch Messung des Zellzyklus zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Wash-out konnte der Zeitpunkt 8 h nach Wash-out als ideal bestätigt werden. So befanden sich JeKo-1 und Will-2 Zellen 4 h nach Wash-out zu 53 % beziehungsweise 9 % in S-Phase und nach 8 h bereits zu 85 % beziehungsweise 79 %. 24 h nach Wash-out befanden sich nur noch 32 % der Mino Zellen im Gegensatz zu 69 % nach 8 h in S-Phase (Abbildung 16). Bei der Zelllinie Mino zeigte sich bei der Folge Abemaciclib → Wash-out → Cytarabin vor allem in den höheren Dosierungen ein deutlicher Synergismus (Tabelle 7). Abbildung 17 und Tabelle 7 zeigen eine Zusammenfassung der Wash-out Versuche. Die Kombination Abemaciclib / Cytarabin mit Wash-out zeigt bei den CellTiter-Glo Messungen in allen Zelllinien außer der resistenten Granta 519 additive und bei Mino stark synergistische Effekte mit errechneten CIs von 0,29 und 0,34 für jeweils 3330 und 10000 nM Cytarabin. Zumindest genauso bemerkenswert war der Effekt, den Abemaciclib auf die Cytarabin-Wirkung zeigte, wenn kein Wash-out durchgeführt wurde: In allen Abemaciclib-sensitiven Zelllinien führte die Induktion des G1-Arrests durch Abemaciclib zu starker Protektion der Zellen gegen die darauffolgende Cytarabinbehandlung (CIs von -0,27 für Mino, -0,15 für JeKo-1, -0,39 für Maver-1 und -0,35 für die DLBCL Zelllinie Will-2 bei 1,11 µM Cytarabin; Tabelle 8). Durch den fortbestehenden G1-Arrest (vgl. Abbildung 9) fehlte der Angriffspunkt für Cytarabin. Zur Bestätigung wurde der gleiche Ansatz an den Zelllinien JeKo-

1 und Maver-1 in den Konzentrationen 31,25 nM Abemaciclib und 1110 nM Cytarabin in Triplikaten aus mindestens 2 unabhängigen Passagen wiederholt und mittels trypanblau Färbung und Durchflusszytometrie ausgewertet. Hierbei zeigten sowohl Mino als auch JeKo-1 mit CIs von jeweils 0,3 und 0,41 nach Kombination mit Wash-out einen starken Synergismus.

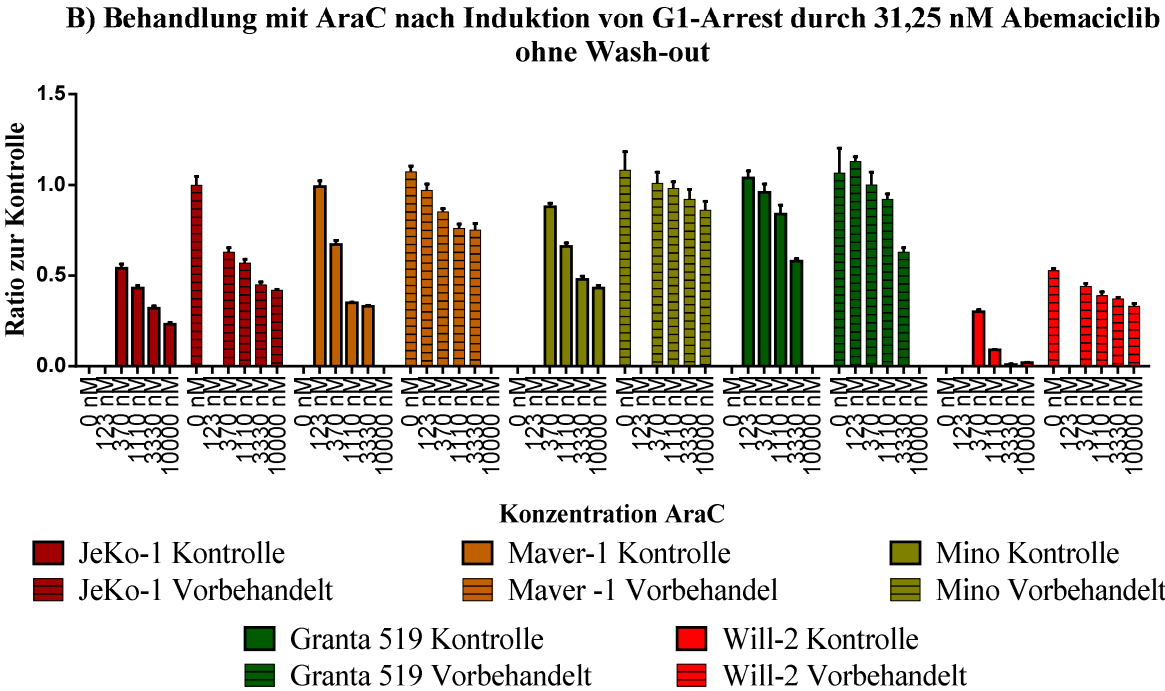
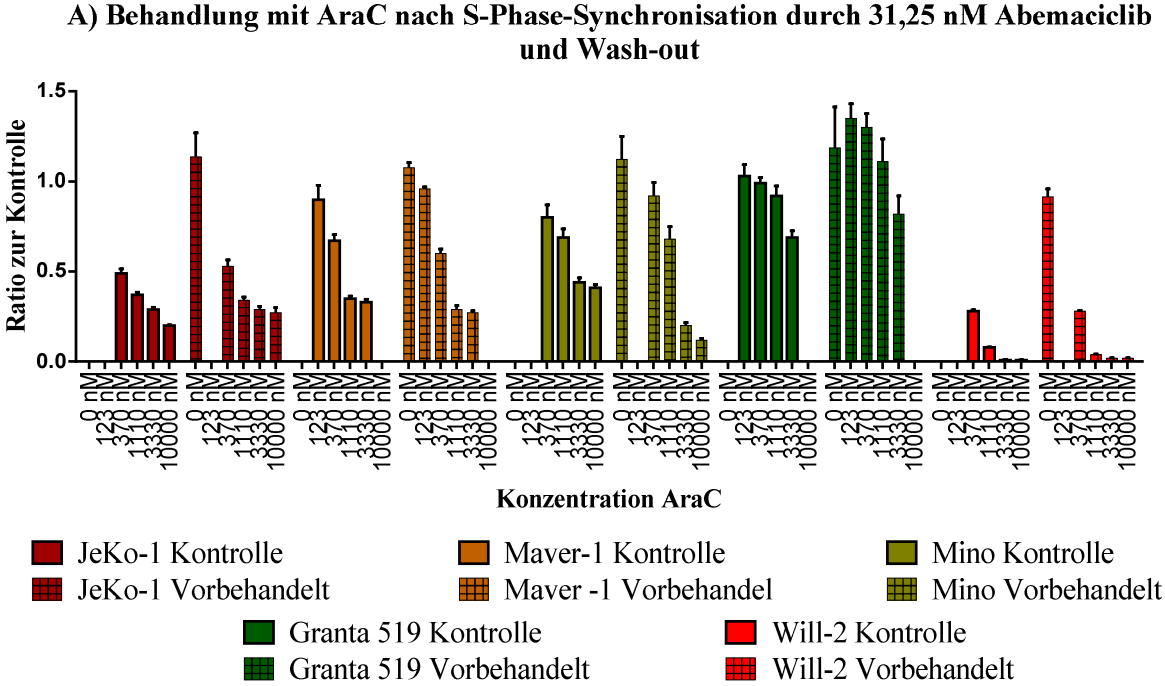


Abbildung 17: Messung des ATP-Gehalts (CellTiter Glo) nach verschiedenen Therapieschemata. JeKo-1, Maver-1, Mino, Granta 519 und Will-2 behandelt mit 123, 370, 1110, 3330 und 10000 nM Cytarabin mit oder ohne Vorbehandlung (31,25 nM

Abemaciclib) und mit (A) oder ohne (B) Wash-out. A) Vor allem bei der Zelllinie Mino ließ sich eine deutliche Effektivitätssteigerung von Cytarabin nach S-Phase-Synchronisation feststellen. B) Bei allen Zelllinien außer der gegenüber Abemaciclib resistenten Granta 519 zeigte sich ein deutlicher protektiver Effekt des anhaltenden G1-Arrests auf die Cytarabinbehandlung. Technische Triplikate mit SD.

Die Ratio zu Kontrolle sank bei Mino von 0,56 (SD 0,03) für Cytarabin alleine auf 0,38 (SD 0,06) und bei JeKo-1 von 0,56 (SD 0,1) auf 0,31 (SD 0,03). In Einklang damit waren die Ergebnisse der Zelltodanalyse mittels Annexin V / 7AAD-Färbung: Bei Mino Zellen ließ sich mit Wash-out eine Zunahme an apoptotischen bzw. toten Zellen von 33,3 (SD 1,01) auf 48,37 (SD 1,35) % ($p=0,0001$) feststellen. Bei JeKo-1 kam es zu einer Zunahme von 32,03 (SD 1,33) % auf 38,27 (SD 0,35) % ($p=0,015$) toter Zellen.

Konzentration AraC:	123 nM	370 nM	1110 nM	3330 nM	10000 nM
CI JeKo-1		0,04	0,08	0,04	-0,04
CI Maver-1	0,01	0,12	0,09	0,09	
CI Mino		-0,02	0,09	0,29	0,34
CI Granta 519	-0,14	-0,13	-0,02	0,00	
CI Will-2		-0,02	0,04	-0,01	-0,01

Tabelle 7: Combination Indices der Kombination Abemaciclib → Wash-out → Cytarabin der in Abbildung 17 A) gezeigten Daten. Ein deutlicher Synergismus ließ sich bei der Zelllinie Mino zeigen. Ansonsten additive Effekte. Durch das geringe Ansprechen der Zelllinie Granta 519 lassen sich auch hier die Werte für diese Zelllinie nur unter Vorbehalt interpretieren.

Konzentration AraC:	123 nM	370 nM	1110 nM	3330 nM	10000 nM
CI JeKo-1		-0,09	-0,15	-0,14	-0,18
CI Maver-1	0,09	-0,14	-0,39	-0,39	
CI Mino		-0,06	-0,27	-0,40	-0,39
CI Granta 519	-0,02	0,02	-0,03	-0,01	
CI Will-2		-0,28	-0,35	-0,36	-0,32

Tabelle 8: Combination Indices der Kombination Abemaciclib → → Cytarabin der in Abbildung 17 B) gezeigten Daten. Hier ließ sich für alle Zelllinien (ausgeschlossen Granta 519) ein deutlicher Antagonismus spätestens ab 1110 nM Cytarabin feststellen.

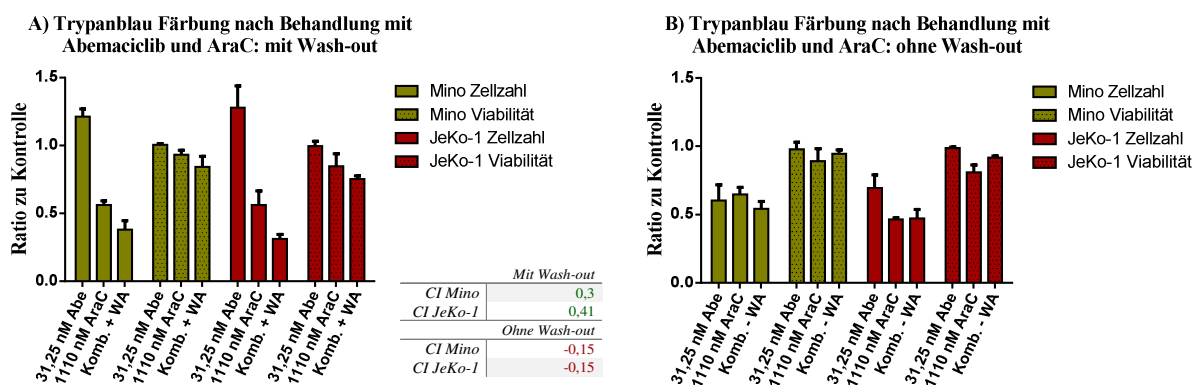
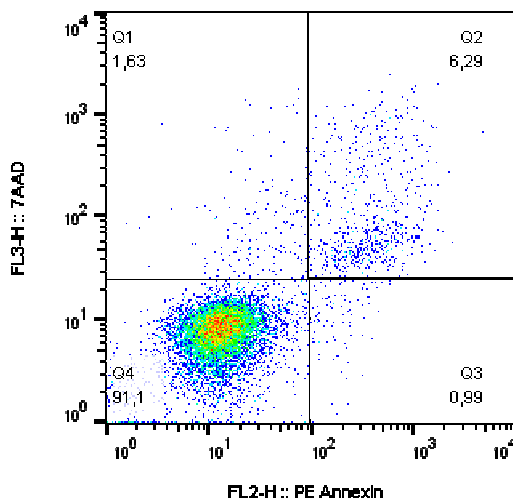


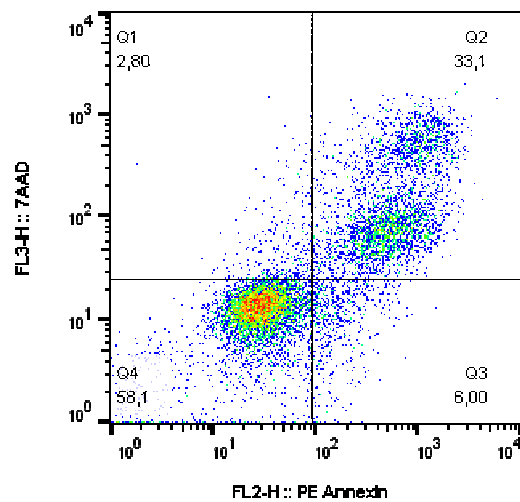
Abbildung 18: Zellzählung und Bestimmung der Viabilität mittels trypanblau Färbung (Vi-Cell XR). Behandlung von Mino und JeKo-1 mit je 31,25 nM Abemaciclib und 1110 nM Cytarabin mit (A) oder ohne (B) Wash-out. Komb.=Kombination; WA=Wash-out. CI= combination Index. Triplikate nach mind. zwei unabhängigen Passagen, Fehlerbalken zeigen SD.

Der Antagonismus bei der Kombination von Abemaciclib und Cytarabin ohne Wash-out bestätigte sich mit CI-Werten von je $-0,15$ für Mino und JeKo-1 ebenfalls (Abbildung 18). Zellen, bei denen kein Wash-out vor Cytarabinbehandlung durchgeführt wurde, zeigten stark verminderte Apoptosewerte verglichen mit Cytarabin Monotherapie. Mino und JeKo-1 zeigten in der Durchflusszytometrie eine Reduktion von jeweils $28,7$ ($SD\ 0,92$) % beziehungsweise $28,6$ ($SD\ 2,07$) % auf $15,2$ ($SD\ 1,44$) % ($p=0,0035$) und $14,87$ ($SD\ 0,72$) % ($p=0,0004$) doppelt positiver Zellen. (Abbildung 19).

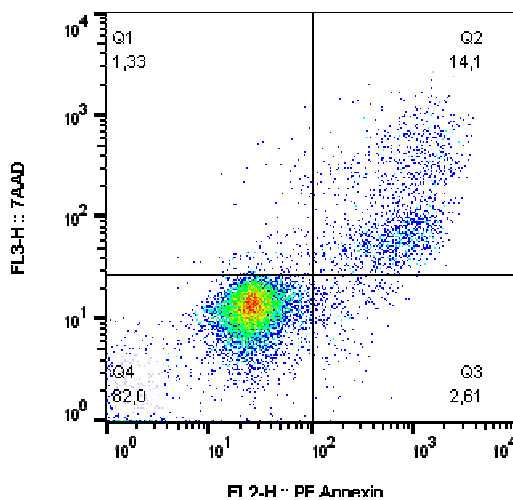
Mino behandelt mit $31,25\text{ nM}$ Abemaciclib und $1,11\ \mu\text{M}$ Cytarabin



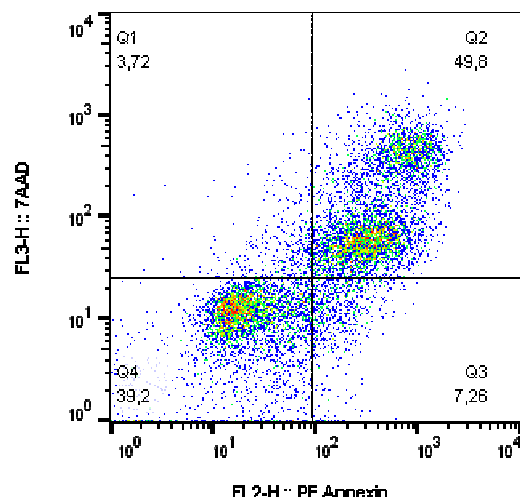
A) Kontrolle



B) AraC alleine



C) Abemaciclib + AraC
OHNE Wash-out



D) Abemaciclib + AraC
MIT Wash-out

Abbildung 19: Zelltodanalyse mittels Annexin V / 7AAD-Färbung (Durchflusszytometrie). Mino Zellen behandelt mit $1,11\ \mu\text{M}$ Cytarabin alleine (B) und ohne (C) oder mit (D) vorherigem Wash-out von $31,25\text{ nM}$ Abemaciclib. Bilder A) und B) stammen aus Ansatz mit Wash-out. A) Kontrolle ($6,83$ ($SD\ 0,71$) % doppelt positiv in Q2). B) Cytarabin alleine zeigte $33,3$ ($SD\ 1,01$) % Q2 Zellen. Nach Wash-out von Abemaciclib (D) waren $48,4$ ($SD\ 1,35$) % der Zellen doppelt positiv. Wurde Mino ohne Wash-

out mit Abemaciclib und Cytarabin behandelt (C) waren nur noch 15,2 (SD 1,44) % der Zellen in Q2. Nicht gezeigt sind: Kontrolle und Cytarabin alleine (jeweils 5,64 (SD 0,34) % und 28,7 (SD 0,92) % doppelt positiv) aus dem Ansatz ohne Wash-out. Bilder sind repräsentativ für Triplikate aus mind. zwei unabhängigen Passagen.

4.2.3. Abemaciclib und weitere Inhibitoren des B-Zell Rezeptor Signalweges

Zur Exploration weiterer Medikamentenkombinationen führten wir an MCL Zelllinien präliminäre Medium-throughput Assay Experimente mittels CellTiter-Glo durch. Getestet wurden Kombinationen mit den PI3K-Inhibitoren Idelalisib (PI3K δ) und Copanlisib (PI3K α/δ), den PI3K/mTOR-Inhibitoren IBL-301 (PIM-1, PI3K, mTOR) und LY3023414 (PI3K, mTOR) und dem Bcl-2-Inhibitor Venetoclax. Einzeln zeigte vor allem IBL-301 gute Wirksamkeit in allen Zelllinien. 0,4 μ M IBL-301 führten bei Mino und Maver-1 zu einer fast vollständigen Zelldepletion mit einer Ratio zu Kontrolle von 0,004 beziehungsweise 0,14. Selbst bei der sonst sehr resistenten Zelllinie Granta 519 war mit einer Ratio zu Kontrolle von 0,64 bei 0,4 μ M IBL-301 der gemessene ATP-Gehalt nach Therapie deutlich geringer als bei Kontrolle. Der PI3K α/δ Inhibitor Copanlisib zeigte in allen getesteten Zelllinien durchschnittliche *in vitro*-Aktivität (z.B. Ratio zu Kontrolle: JeKo-1:0,58 oder Granta 519 0,62 bei 4 μ M). Bei dem PI3K δ Inhibitor Idelalisib war mittels CellTiter-Glo keine deutliche Wirkung auf die behandelten Zelllinien zu messen (Ratio zu Kontrolle: Mino 0,87 oder Maver-1 0,98 bei 4 μ M). Nach Vorbehandlung mit Abemaciclib zeigte sich bei JeKo-1 ein Synergismus für Abemaciclib und Copanlisib mit CIs von 0,095 bei 0,25 μ M bis 0,12 bei 4 μ M. Für alle anderen Zelllinien und für die Kombinationen mit Idelalisib sowie IBL-301 ergaben sich anhand der errechneten CIs überwiegend additive Effekte der Kombinationstherapien (Tabelle 9).

[c] in μ M	Idelalisib			Copanlisib			IBL-301		
	0,25	1	4	0,25	1	4	0,025	0,1	0,4
CI Jeko -1	0,08	0,14	0,01	0,10	0,11	0,12	0,07	0,22	0,08
CI Maver-1	0,09	0,01	0,07	0,09	0,07	-0,02	0,14	0,04	-0,23
CI Mino	-0,03	-0,03	-0,07	-0,07	-0,07	-0,12	-0,06	-0,16	-0,01
CI Granta 519	0,07	0,02	0,07	0,00	0,00	-0,01	0,04	0,03	-0,04

Tabelle 9: Combination Indices für die MCL Zelllinien behandelt mit 31,25 nM Abemaciclib für 24 h und anschließend mit aufsteigenden Konzentrationen Idelalisib, Copanlisib oder IBL-301. JeKo-1 zeigte einen Synergismus in allen Konzentrationen bei Abemaciclib / Copanlisib, darüber hinaus ergaben sich additive Effekte.

Der Bcl-2-Inhibitor Venetoclax zeigte sehr starke Wirkung in niedrigen Dosierungen bei Mino und Maver-1 mit einer Ratio zu Kontrolle von 0,08 beziehungsweise 0,00072 bereits bei 62,5 nM, mittlere Wirkung bei Granta 519 und schlechte Wirkung bei JeKo-1 (Ratio zu

Kontrolle jeweils 0,49 beziehungsweise 0,78 für 62,5 nM Venetoclax). LY3023414 zeigte gute Aktivität in mittleren Konzentrationen bei allen getesteten Zelllinien (Ratio zu Kontrolle bei 250 nM: JeKo-1 0,36; Maver-1 0,35; Mino 0,52; Granta 519 0,55). Daraufhin führten wir an Mino und Granta 519 Zellzyklus- und Zelltodanalysen mittels Durchflusszytometrie zum besseren Verständnis der Wirkung dieser beiden Substanzen durch. Der Bcl-2 Inhibitor Venetoclax wurde in der geringeren Konzentration von 31,25 nM verwendet. Venetoclax zeigte keine Auswirkungen auf den Zellzyklus, jedoch eine Zunahme toter und präapoptotischer Zellen (Q2 + Q3) unter Therapie nach 48 h bei Mino um 33,37 (SD 4,13) % und bei Granta 519 um 31,15 (SD 4,49) % im Vergleich zu Kontrolle (Abbildung 20). LY3023414 hatte in einer Konzentration von 500 nM mit Zunahme apoptotischer Zellen von unter zehn Prozent in sowohl Mino als auch Granta 519 keine nennenswerten Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen. Es führte jedoch vor allem bei Mino zu einem ausgeprägten G1-Arrest mit Zunahme der Zellen in G1/G0-Phase um +40,73 (SD 3,72) % nach 48 h (Abbildung 21). Bei Venetoclax in Kombination mit Abemaciclib zeigte sich interessanterweise ein deutlicher Antagonismus in den Zelllinien Mino und JeKo-1 sowie mit CIs von -0,096 und -0,098 für 62,5 und 250 nM ein grenzwertiger Antagonismus bei Granta 519 (Tabelle 10). Demgegenüber zeigt LY3023414 ausschließlich additive Effekte bei der Kombination mit Abemaciclib (Tabelle 10).

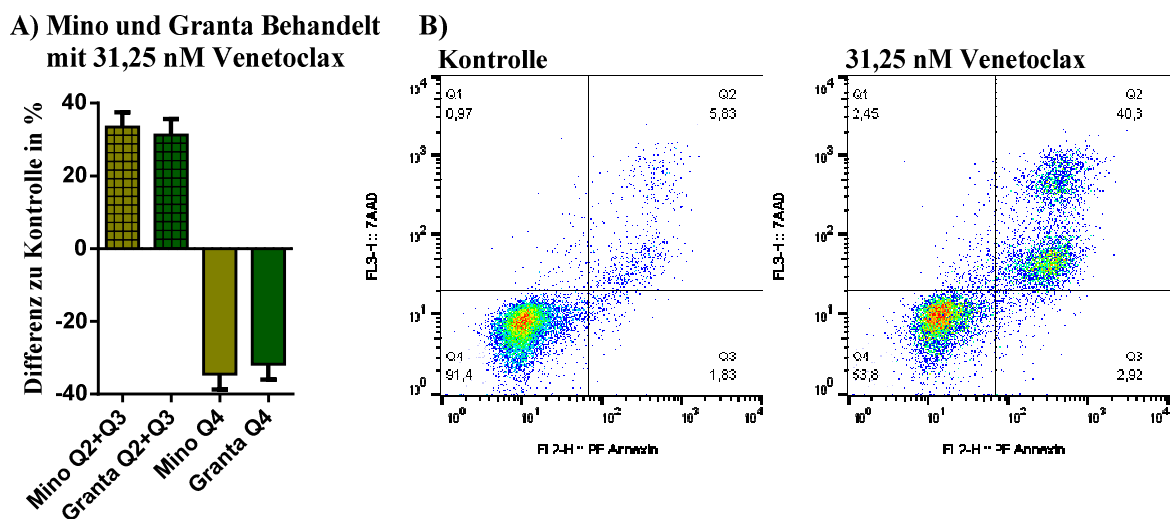


Abbildung 20: Zelltodanalyse mittels Annexin V / 7AAD-Färbung (Durchflusszytometrie). Mino und Granta 519 behandelt mit 31,25 nM Venetoclax für 48 h. Q2 und Q3 fassen alle präapoptotischen (Q3) und toten (Q2) Zellen zusammen. In Q4 befanden sich viable Zellen. A) Differenz zu unbehandelter Kontrolle in % Zellen. B) Beispielhafte Darstellung der Density Plots von Mino Zellen, unbehandelt (Kontrolle) und nach 31,25 nM Venetoclax. Triplikate nach mind. zwei unabhängigen Passagen, Fehlerbalken zeigen SD.

**Zellzyklus Mino und Granta 519
nach 500 nM LY3023414**

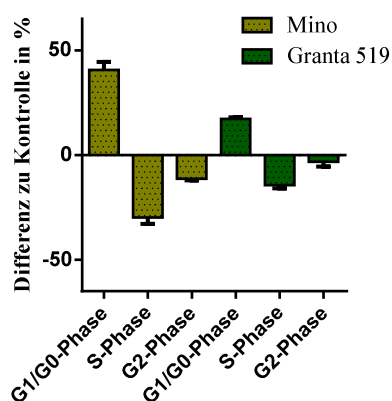


Abbildung 21: Zellzyklusanalyse mittels PI-Färbung (Durchflusszytometrie). Mino und Granta 519 48 h nach Behandlung mit 500 nM LY3023414. Differenz zu unbehandelter Kontrolle in % Zellen. Triplikate nach mind. zwei unabhängigen Passagen, Fehlerbalken zeigen SD.

	Venetoclax				LY3023414			
[c] in nM	62,5	250	1000	4000	62,5	250	1000	4000
CI Jeko -1	-0,18	-0,06	-0,05	-0,18	-0,02	-0,02	-0,01	-0,01
CI Maver-1	-0,06	0,00	0,00	0,00	-0,03	-0,04	-0,02	-0,03
CI Mino	-0,27	-0,18	-0,06	0,00	-0,01	0,00	-0,03	-0,03
CI Granta 519	-0,10	-0,10	-0,07	-0,08	-0,07	-0,04	-0,04	-0,03

Tabelle 10: Combination Indices für MCL Zelllinien behandelt mit 31,25 nM Abemaciclib und Venetoclax bzw. LY3023414. Messung mittels CellTiter-Glo. Bei JeKo-1, Maver-1 und Granta 519 ließen sich vor allem in den niedrigen Konzentrationen Antagonismen bei der Kombination Abemaciclib / Venetoclax nachweisen. Abemaciclib / LY3023414 zeigten additive Effekte.

4.2.4. Primäre Zellen behandelt mit Abemaciclib alleine und in Kombination

Um die Aktivität des CDK4/6-Inhibitors auch an primären Zellen zu testen, wurden Lymphozyten aus Vollblut eines gesunden Probanden gewonnen sowie bereits zuvor akquirierte Zellen zweier Mantelzelllymphompatienten in leukämischer Phase aufgetaut und getestet. Die Versuche wurden parallel an den Zelllinien JeKo-1 oder Mino durchgeführt. Bei den primären Zellen des gesunden Probanden erzielte Cytarabin lediglich in den Konzentrationen 500 und 1000 nM mit einer Ratio zu Kontrolle von 0,88 beziehungsweise 0,64 einen gewissen Effekt. Dieser relativierte sich nach Kombination mit Abemaciclib in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.2.2 auf eine Ratio zu Kontrolle von 0,94 beziehungsweise 0,79 (Abbildung 22). Die Zellen von Patient 1 und 2, behandelt mit Abemaciclib und Ibrutinib zeigten bei Patient 1 einen stark protektiven Effekt der Abemaciclibbehandlung auf die Zellen: Ratio zu Kontrolle 72 h nach Behandlung 2,05.

Ibrutinib alleine zeigte mit einer Ratio zu Kontrolle von 0,82 eine mäßige Wirkung und hob in Kombination mit Abemaciclib dessen protektive Wirkung teilweise wieder auf (Ratio zu Kontrolle 1,15) (Abbildung 23). Ibrutinib zeigte mit einer Ratio zu Kontrolle von 0,22 nach 72 h bei Patient 2 sehr gute Wirksamkeit, bei Abemaciclib ließ sich mit einer Ratio zu Kontrolle von 0,92 der an Patient 1 beobachtete protektive Effekt nicht reproduzieren und eine Kombination beider erbrachte keinen zusätzlichen Effekt (Abbildung 23).

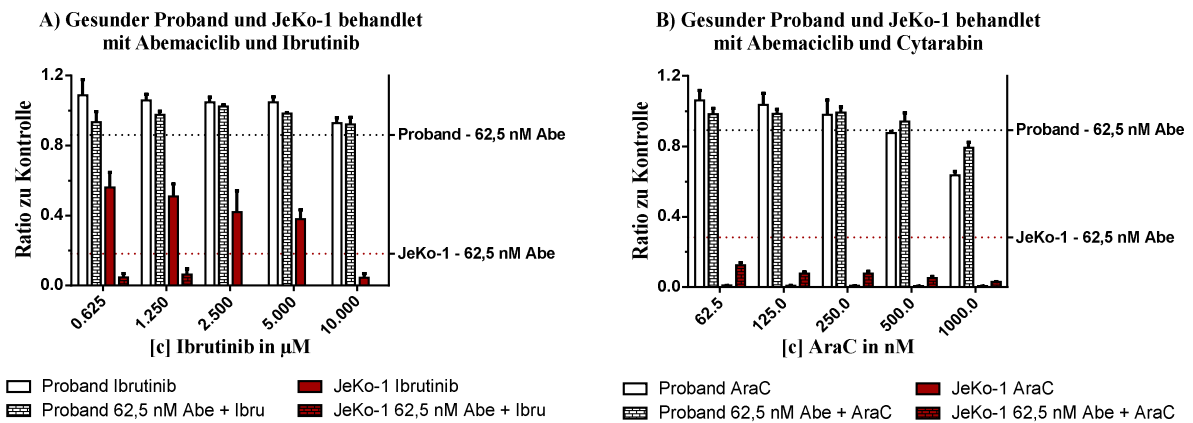


Abbildung 22: Primäre Lymphozyten aus gesundem Spendervollblut gewonnen, behandelt mit A) Abemaciclib und Ibrutinib und B) Abemaciclib und Cytarabin. Gemessen nach 72 h mittels CellTiter-Glo. Technische Triplikate mit SD.

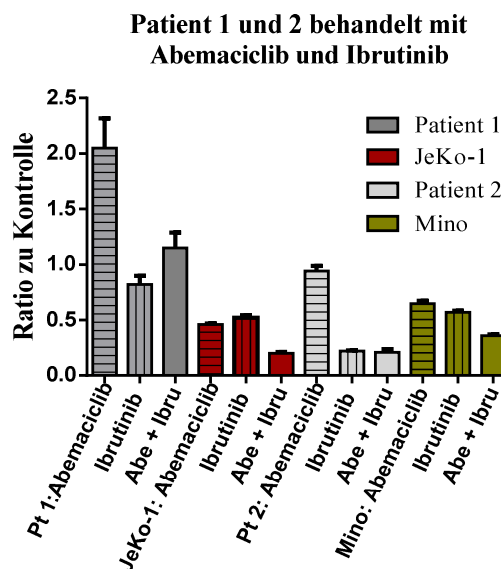


Abbildung 23: Patientenzellen behandelt mit 31,25 nM Abemaciclib, 250 nM Ibrutinib und der Kombination aus beiden. Messung nach 48 h mittels CellTiter-Glo. Parallel wurden JeKo-1 bzw. Mino Zellen in gleicher Weise behandelt.

Cytarabin zeigte bei Patient 2 in Einzeltherapie und in Kombination mit Abemaciclib selbst in sehr hohen Konzentrationen von 10 μM nur einen bedingten Effekt auf die primären Zellen: Ratio zu Kontrolle 0,82 alleine und 0,97 in Kombination bei Abemaciclib mit Wash-out, sowie

0,8 alleine und 0,68 in Kombination bei Abemaciclib ohne Wash-out (Abbildung 24 A). Bei der Zellzyklusanalyse der primären Zellen stellte sich heraus, dass sich einschließlich der unbehandelten Kontrollen so gut wie alle Zellen in G1/G0-Phase befanden (Abbildung 24 B, C).

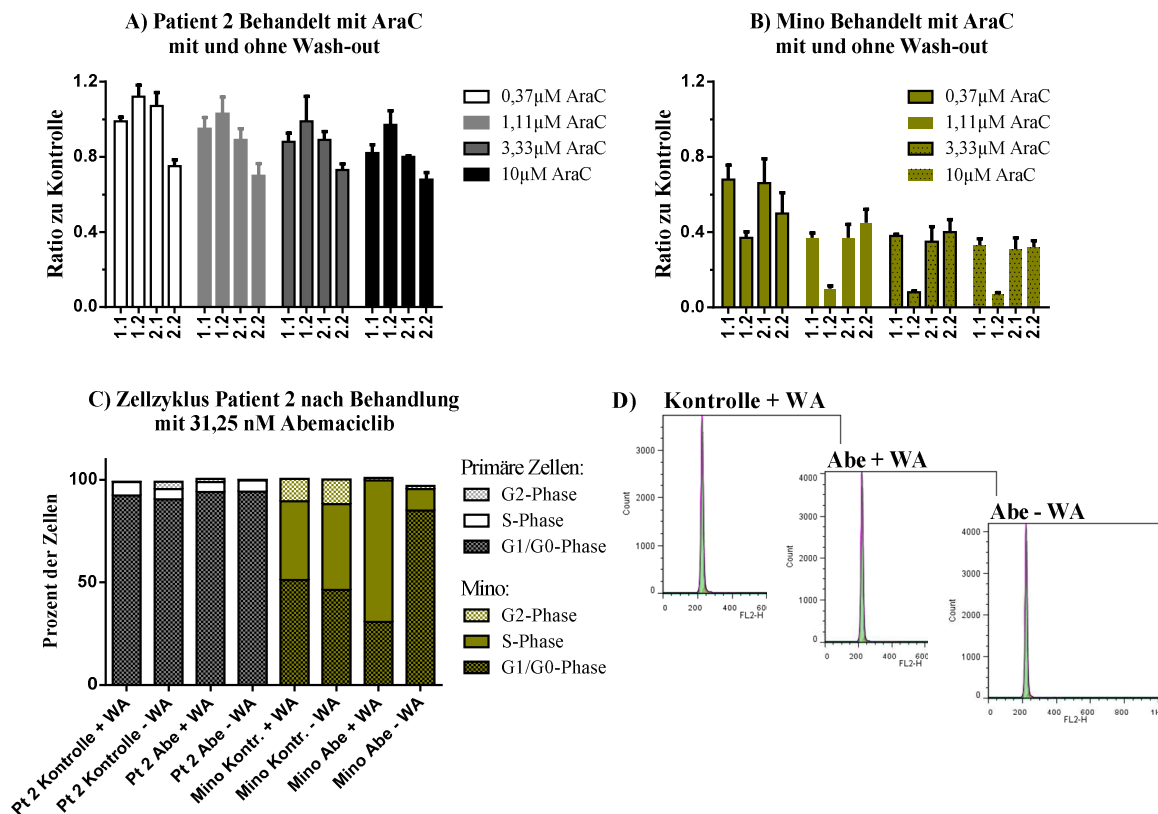


Abbildung 24: Patient 2 und Mino behandelt nach dem Wash-out Protokoll (Vgl. Kapitel 4.2.2) und gemessen mittels CellTiter-Glo. A) und B): 1.1 - Kontrolle mit Wash-out; 1.2 - Vorbehandelt mit Wash-out; 2.1 - Kontrolle ohne Wash-out; 2.2 - Vorbehandelt ohne Wash-out. Vorbehandlung mit 31,25 nM Abemaciclib. Behandlung mit Abemaciclib alleine (nicht gezeigt): Ratio zu Kontrolle je 1,14 (SD 0,1) bzw. 0,8 (SD 0,09) mit bzw. ohne Wash-out für Patient 2 und 0,79 (SD 0,08) mit bzw. ohne Wash-out für Mino. C) Zellzyklusanalyse mittels PI-Färbung (Durchflusszytometrie) 32 h nach Vorbehandlung. D) Beispielfhafte Histogramme der in C) gezeigten Daten. Technische Triplikate mit SD.

4.3. Western-Blot

Um die Effekte des CDK4/6-Inhibitors Abemaciclib alleine sowie in Kombination mit Ibrutinib auf molekularer Ebene besser verstehen zu können, führten wir Western-Blot Analysen der Proteinexpression von für den Zellzyklusprogress wichtigen Proteinen (Rb, ph.Rb(Ser795), CDK2, CDK4, Cyclin D1) und von Proteinen des B-Zell Rezeptor Signalweges (Akt, ph.Akt(Ser473; Thr308), mTOR, ph.mTOR(Ser2443), Rictor, ph.Rictor(Thr1135), Btk, ph.Btk(Tyr223), Syk, ph.Zap70(Tyr319)/Syk(Tyr352), PLC γ 2, p44/42MAPK, ph.p44/42 MAPK(Thr202/Tyr204), MEK1/2, ph.MEK1/2(Ser217/221), p100/52 NF- κ B, PARP/cleaved

und PIM-1) durch. Die Zellen wurden für 4, 8 und 24 h mit je 31,25 nM Abemaciclib, 250 nM Ibrutinib oder einer Kombination beider behandelt, lysiert und die Proteine wie zuvor beschrieben extrahiert. Die nach 4 h Inkubation gewonnenen Proteine zeigten sehr hohe Schwankungen und werden in dieser Arbeit nicht weiter besprochen. Bei Behandlung mit Abemaciclib alleine und in Kombination mit Ibrutinib zeigte sich eine starke Inhibierung der Expression von Retinoblastom-Protein und phosphoryliertem Retinoblastom-Protein (Serin 795) sowohl nach 8 als auch nach 24 h in allen Zelllinien und eine überwiegend konstante Expression von CDK2, CDK4, und Cyclin D1 (Abbildung 25). Interessanterweise kam es unter Abemaciclib nach 24 h zu einer deutlich verminderten Expression von phosphoryliertem Akt (Serin 473 und Threonin 308) in den Zelllinien JeKo-1 und Mino, nicht jedoch in Granta 519 (Abbildung 27). In Maver-1 waren weder Akt noch die phosphorylierten Formen von Akt in Kontroll- oder behandelter Population nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Weitere Proteine der Zellzyklusregulierung und des BCR Signalweges sowie deren phosphorylierter Formen waren schwieriger nachzuweisen und zeigten keine so deutlichen Tendenzen. mTOR und ph.mTOR(Ser2448) sowie Rictor zeigten in keiner der MCL Zelllinien nach Abemaciclib-Behandlung relevante oder in unterschiedlichen Zelllinien reproduzierbare Veränderungen (Abbildung 26). Die Expression von ph.Rictor(Thr1135) war in JeKo-1, Mino und Maver-1 leicht vermindert, in Granta 519 unverändert. Hierbei war der Effekt nach 8 h deutlicher ausgeprägt als nach 24 h. Bei der Analyse des B-Zell Rezeptor Signalweges zeigte sich unter Ibrutinib-Therapie eine deutliche Verminderung der Expression von ph.Btk(Tyr223) und ph.Zap70(Tyr319)/Syk(Tyr352) bei konstanter Expression der nicht phosphorylierten Formen beider Proteine. Sowohl ph.Btk(Tyr223) als auch ph.Zap70(Tyr319)/Syk(Tyr352) waren ebenfalls unter der Kombinationstherapie Abemaciclib / Ibrutinib vermindert (Abbildung 28). Die an Ser217 und 221 phosphorylierte Form von MEK1/2 war bei Granta 519 unter Abemaciclib-Therapie deutlich verstärkt exprimiert, bei konstanter Expression von unphosphoryliertem MEK1/2 (Abbildung 27). Alle anderen Zelllinien zeigten keine starken Veränderungen im Expressionsmuster von MEK1/2 und ph.MEK1/2(Ser217/222). In den Zelllinien JeKo-1 und Mino ließ sich außerdem eine nach Behandlung mit Abemaciclib verringerte Expression von PIM-1 feststellen: Bei JeKo-1 war die Expression der 34 kDa-Einheit bei behandelten Zellen auf 56,5 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Bei Mino war die Expression nach Abemaciclib noch deutlicher auf 15,7 und 37 % für die 34 und 44 kDa Einheiten reduziert (Daten nicht gezeigt, Quantifizierung mittels FusionCapt Advance, s.u.). Die Analyse von p42/44 MAP-Kinase und deren phosphorylierten Formen sowie von allen weiteren untersuchten Proteinen erbrachten in den verschiedenen MCL Zelllinien kein unter

Therapie einheitlich verändertes Expressionsmuster im Vergleich zur Kontrolle. Es kam darüber hinaus nicht zu einer Zunahme der Expression von PARP/cleaved nach Behandlung mit Abemaciclib, Ibrutinib oder der Kombination beider (Daten nicht gezeigt).

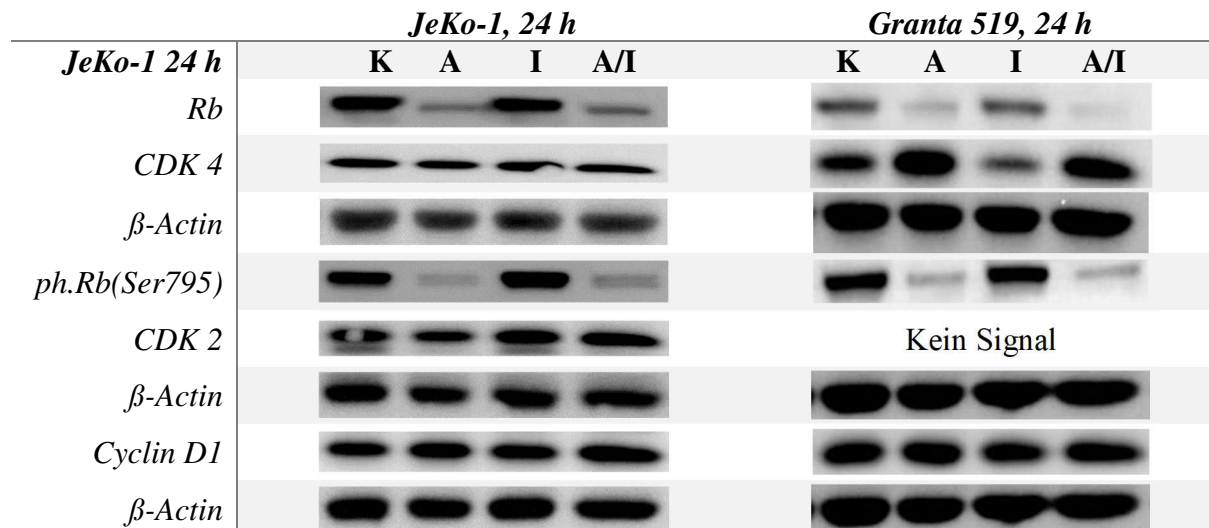


Abbildung 25: Proteinexpression nach 24 h, gemessen mittels Western-Blot; beispielhaft an *JeKo-1* und *Granta 519* für *Rb*, *ph.Rb(Ser795)*, *CDK2*, *CDK4* und *Cyclin D1*. K=Kontrolle, A=31,25 nM Abemaciclib, I=250 nM Ibrutinib, A/I=Kombination. Ladekontrolle mit β -Actin jeweils für die darüberliegenden Blots.

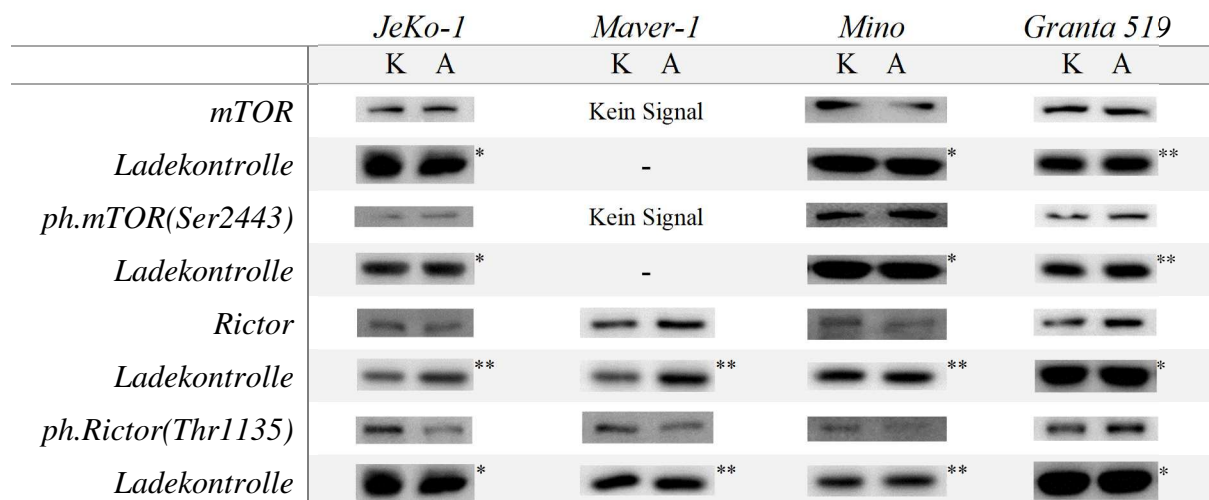


Abbildung 26: Proteinexpression nach 8 h, gemessen mittels Western-Blot für *mTOR*, *ph.mTOR(Ser2448)*, *Rictor* und *ph.Rictor(Thr1135)*. K=Kontrolle, A=31,25 nM Abemaciclib. Ladekontrolle mit β -Actin (*) oder GAPDH(**) jeweils für die darüberliegenden Blots.

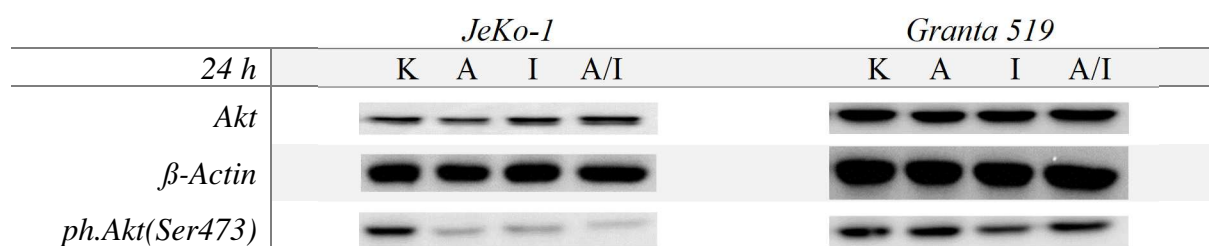




Abbildung 27: Proteinexpression nach 24 h, gemessen mittels Western-Blot, beispielhaft an JeKo-1 und Granta 519 für Akt, ph.Akt(Ser473), ph.Akt(Thr308), MEK1/2 und ph.MEK1/2(Ser217/221). K=Kontrolle, A=31,25 nM Abemaciclib, I=250 nM Ibrutinib, A/I=Kombination beider. Ladekontrolle mit β -Actin oder GAPDH jeweils für die darüberliegenden Blots.

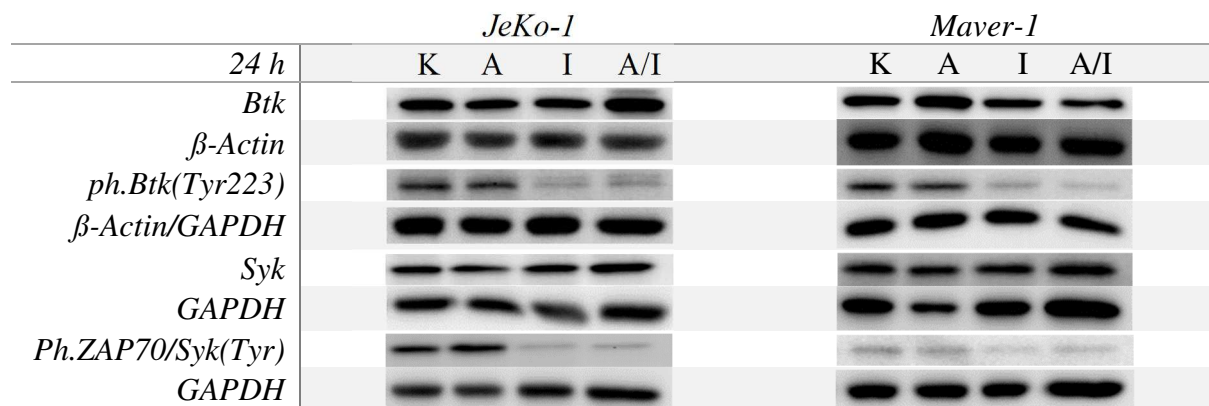


Abbildung 28: Proteinexpression nach 24 h, gemessen mittels Western-Blot, beispielhaft an JeKo-1 und Maver-1 für Btk, ph.Btk(Tyr223), Syk und ph.Zap70(Tyr319)/Syk(Tyr352). K=Kontrolle, A=31,25 nM Abemaciclib, I=250 nM Ibrutinib, A/I=Kombination beider. Ladekontrolle mit β -Actin oder GAPDH jeweils für die darüberliegenden Blots.

Bei der anschließenden Quantifizierung der Proteinexpression wichtiger Enzyme werteten wir eine Verminderung der Proteinexpression auf weniger als die Hälfte (Ratio zu Kontrolle $< 0,5$) beziehungsweise eine Steigerung der Expression auf das Doppelte (Ratio zu Kontrolle $> 2,0$) als relevant. Diese hohen Cut-off Werte sollten dazu dienen, die verfahrensgebundenen Schwankungen zu berücksichtigen und stochastische Veränderungen so gut wie möglich auszuschließen. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse ist in [Tabelle 12](#) zu finden. Eine genauere Betrachtung der Daten aus [Tabelle 12](#) lässt erkennen, dass sich ein Effekt meist bereits nach 8 h andeutet und, ähnlich der Zellzyklusinhibition, nach 24 h voll ausgeprägt ist. So ist Rb nach 8 h bei Maver-1 mit einer Ratio zu Kontrolle von 0,51 und 1,29 für Abemaciclib alleine und in Kombination mit Ibrutinib noch nicht vollständig supprimiert. Nach 24 h ist die Rb-Expression mit 0,08 beziehungsweise 0,12 sowohl bei Inkubation mit Abemaciclib alleine als auch in Kombination potent herunterreguliert.

Auf Basis dieser Daten wurde eine deskriptive statistische Analyse durchgeführt. Hierbei zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede der Proteinexpression von Rb und

ph.Rb(Ser795) im Vergleich zur Kontrolle sowohl nach 8, als auch nach 24 h für Abemaciclib alleine. Bei der Kombination von Abemaciclib und Ibrutinib konnte nach 24 h ebenfalls eine statistisch signifikant verminderte Expression dieser beiden Proteine gezeigt werden (Tabelle 11). Außerdem ergab sich bei Ibrutinib in Einzelbehandlung eine signifikante und in Kombination eine mit $p=0,057$ marginal nicht signifikante Verminderung von an Tyrosin 223 phosphoryliertem Btk nach 24 h. Die Expression der anderen Proteine zeigte zelllinienübergreifend keine signifikanten Unterschiede. In der multivariaten Analyse konnte bestätigt werden, dass die Proteinexpression nach 24 h von Rb, ph.Rb(Ser795) und ph.Btk(Tyr223) in den verschiedenen Behandlungsarmen signifikant unterschiedlich war (Rb: $H=11,58$; $p<0,001$; ph.Rb(Ser795): $H=11,58$; $p<0,001$; ph.Btk(Tyr223): $H=10,01$; $p<0,005$). Im post-Test, bei dem die Behandlungsarme direkt gegen die Kontrolle getestet wurden, erwies sich die Expression von Rb sowohl für Abemaciclib ($n_1=n_2=4$; *Mean Rank Diff.* = -8,250; $p=0,04$) als auch für Abemaciclib / Ibrutinib ($n_1=n_2=4$; *Mean Rank Diff.* = -9,250; $p=0,018$) als signifikant vermindert. Sowohl ph.Rb(Ser795) (Abemaciclib: $n_1=n_2=4$; *Mean Rank Diff.* = -7,750; $p=0,0641$; Abemaciclib / Ibrutinib: $n_1=n_2=4$; *Mean Rank Diff.* = -6,750; $p=0,135$) als auch ph.Btk(Tyr223) (Ibrutinib sowie Abemaciclib / Ibrutinib: je $n_1=n_2=4$; *Mean Rank Diff.* = -8,000; $p=0,0526$) konnten im post-Test der multivariaten Analyse marginal keine Signifikanz erreichen.

	<i>Median Kontrolle</i>	<i>Median Behandelt</i>	<i>Ränge K ges.</i>	<i>Ränge A ges.</i>	<i>U-Wert</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Rb 8 h Abe</i>	0,7654	0,1891	38	17	2	0,0317
<i>Rb 24 h Abe</i>	1,572	0,1233	26	10	0	0,0286
<i>Rb 8 h Komb.</i>	0,7654	0,6759	30	25	10	0,6667
<i>Rb 24 h Komb.</i>	1,572	0,09774	26	10	0	0,0286
<i>phRb 8 h Abe</i>	0,6616	0,1848	40	15	0	0,0079
<i>phRb 24 h Abe</i>	1,099	0,02661	26	10	0	0,0286
<i>phRb 8 h Komb.</i>	0,6616	0,2773	37	18	3	0,0556
<i>phRb 24 h Komb.</i>	1,099	0,0623	26	10	0	0,0286
<i>phBtk 8 h Ibru</i>	0,156	0,0412	33	22	7	0,3095
<i>phBtk 24 h Ibru</i>	0,1795	0,02732	26	10	0	0,0286
<i>phBtk 8 h Komb.</i>	0,156	0,05568	32	23	8	0,4127
<i>phBtk 24 h Komb.</i>	0,1795	0,01565	25	11	1	0,0571

Tabelle 11: Mann-Whitney Test der quantifizierten Proteine nach Western-Blot. K = Kontrolle, A = Abemaciclib.

8 h	Rb			phRb (Thr795)			CDK 4			Cyclin D1			CDK 2		
	A	I	A/I	A	I	A/I	A	I	A/I	A	I	A/I	A	I	A/I
JeKo-1	0,25	1,79	1,77	0,25	1,21	1,13	1,16	1,20	1,31	1,93	2,70	2,43	1,09	1,27	1,90
Maver-1	0,51	0,64	1,29	0,20	0,20	0,38	1,29	1,01	1,55	1,32	1,12	1,34	0,96	0,64	1,00
Mino	0,47	1,08	2,75	0,44	1,82	0,76	1,04	0,90	4,14	1,22	1,23	4,66	1,05	1,30	1,45
Granta 519	0,10	0,09	0,20	0,07	0,03	0,20	1,78	1,16	1,95	1,62	1,40	2,43	X	X	X
Will-2	0,25	0,83	0,24	0,36	0,71	0,10	0,93	0,87	0,64	X	X	X	1,43	1,03	0,77
24 h	A	I	A/I	A	I	A/I	A	I	A/I	A	I	A/I	A	I	A/I
JeKo-1	0,14	0,97	0,16	0,03	2,01	0,08	0,87	0,88	0,86	1,56	1,08	1,60	1,34	1,52	1,57
Maver-1	0,08	0,92	0,12	0,00	1,29	0,03	0,97	1,02	0,91	1,43	0,89	1,14	0,61	0,47	0,38
Mino	0,04	0,26	0,03	0,02	0,74	0,01	1,01	0,44	0,78	0,54	0,22	0,48	0,65	1,07	0,95
Granta 519	0,21	1,02	0,03	0,18	1,29	0,21	2,76	0,50	1,79	1,43	1,06	1,62	X	X	X

8 h	Akt			phAkt (Thr308)			phAkt (Ser473)			Btk			phBtk (Tyr223)		
	A	I	A/I	A	I	A/I	A	I	A/I	A	I	A/I	A	I	A/I
JeKo-1	1,05	1,01	1,04	1,38	0,88	0,26	1,74	0,76	0,01	1,48	2,84	3,34	0,97	0,36	0,49
Maver-1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	2,26	1,00	2,15	1,31	0,41	0,36
Mino	1,03	1,05	4,81	1,21	1,51	1,74	0,54	0,20	0,04	0,98	1,07	4,30	2,50	0,25	0,58
Granta 519	0,90	0,97	1,10	X	X	X	1,27	0,39	1,25	0,83	0,31	0,99	0,87	0,00	0,00
Will-2	0,67	0,91	0,76	0,85	0,57	0,23	1,16	5,88	2,31	0,76	0,29	0,06	0,74	0,55	0,60
24 h	A	I	A/I	A	I	A/I	A	I	A/I	A	I	A/I	A	I	A/I
JeKo-1	0,82	1,02	1,19	0,52	0,97	0,17	0,21	0,20	0,05	0,92	0,80	1,79	0,90	0,14	0,18
Maver-1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0,96	0,81	0,54	0,82	0,16	0,03
Mino	0,36	0,31	0,27	0,58	2,06	1,20	0,13	3,78	1,50	0,41	0,19	0,36	0,93	0,05	0,11
Granta 519	0,93	0,89	0,87	X	X	X	1,41	0,78	1,44	0,92	0,72	0,62	0,72	0,00	0,00

Tabelle 12: Quantitative Auswertung der mit Western-Blot gemessenen Proteinexpression. Zellen behandelt mit 31,25 nM Abemaciclib (A), 250 nM Ibrutinib (I) und der Kombination beider (A/I). Zahlenwert steht für die zur Ladekontrolle kontrollierte Ratio zu unbehandelter Kontrolle. Werte über 2 werden rot, Werte unter 0,5 grün abgebildet.

5. Diskussion

5.1. Abemaciclib hemmt Zellwachstum beim MCL durch potenten G1-Arrest

Es gibt mittlerweile viele sowohl präklinische als auch klinische Daten zur CDK4/6-Inhibition und dessen Wirkung auf diverse Tumorentitäten^[219]. Demnach führt die spezifische Hemmung der Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 zu einem nicht-toxischen, reversiblen G1-Arrest durch Dephosphorylierung des Zielproteins Rb^[102, 158]. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Zellzyklusinhibition durch Hemmung des Cyclin D-CDK4/6-Komplexes mit Abemaciclib auch beim Mantelzelllymphom *in vitro* ein effektives Mittel zur Verringerung der Proliferation maligner Zellen ist. Abemaciclib führte bereits in geringen Dosen nach 24 h zu einem nahezu vollständigen, nicht-toxischen und damit reversiblen G1-Arrest (Abbildung 9 B), Abbildung 10). Die bereits nach den ersten Zellzählungsversuchen postulierte rein zytostatische Natur kann durch Zusammenschau unserer Zellzählungs-, durchflusszytometrischen und Western-Blot Daten sowohl auf zytologischer als auch auf molekularbiologischer Ebene mit einiger Sicherheit bestätigt werden. Mino, Maver-1 und JeKo-1 reagierten dabei in allen Bereichen deutlich sensitiver als Granta 519 (Abbildung 6; Abbildung 9 - Abbildung 11). Die scheinbare Diskordanz zwischen dem Eintreten des G1-Arrests nach 24 h und sichtbarer Zellproliferationshemmung nach 48 und 72 h, liegt wahrscheinlich an den vergleichsweise langsamen Verdopplungszeiten der Zellen, verknüpft mit der lediglich zytostatischen Wirkung von Abemaciclib (s.u., ^[219]). Eine Zellzyklusdauer (und damit die Verdopplungszeit) hängt zwar von vielen Faktoren ab, wie Temperatur oder Zelltyp, beträgt aber in der Regel circa 24 h: Normale Zwiebelzellen (*Allium Cepa*) beispielsweise haben bei Raumtemperatur eine Verdopplungszeit von circa 19 h^[220], für die Zelllinien JeKo-1, Mino und Granta 519 werden Verdopplungszeiten zwischen 24 und 72 h angegeben^[221, 222]. Daraus lässt sich folgern, dass die Wirkung des Inhibitors auf molekularer Ebene nach 24 h bereits ihr Maximum erreicht hat, wie anhand von Durchflusszytometrie und Western-Blot gezeigt (vgl. Kapitel 4). Dagegen haben die unbehandelten Zellen zu diesem Zeitpunkt noch nicht stark genug proliferiert, um einen deutlichen Effekt auch auf zytologischer Ebene erkennen zu lassen.

Bei genauerer Betrachtung der Zellzählungsdaten scheint sich ab 31,25 nM Abemaciclib bei den Zelllinien JeKo-1 und Will-2 ein Plateau zu bilden (vgl. Abbildung 5; Abbildung 8). Dies ist möglicherweise Ausdruck davon, dass bereits ab Konzentrationen im mittleren zweistelligen Nanomolarbereich die maximal erreichbare Wirksamkeit eintritt. In diesen niedrigen Konzentrationen ist eine off-Target Hemmung anderer Enzyme unwahrscheinlich^[158].

Auf molekularer Ebene zeigt sich die gute Wirkung von Abemaciclib vor allem am direkten Cyclin D-CDK4/6 Ziel, dem Retinoblastom-Protein. Die CDK4/6-Hemmung führte zur deutlichen Verminderung von phosphoryliertem Rb. Diesem Mechanismus wird die größte Bedeutung für die zytostatische Wirkung der CDK4/6-Inhibitoren zugesprochen^[103, 223-225]. Bei Betrachtung der Proteinexpression und Phosphorylierung mittels Western-Blot, konnten wir dies bestätigen und bei Behandlung mit Abemaciclib eine deutliche Suppression von ph.Rb(795) in allen Zelllinien feststellen. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten^[103, 224] war der beste Zeitpunkt für die Proteinmessung nach 24 h. Darüber hinaus konnten wir allerdings eine wenigstens genauso starke Suppression der Expression von nicht phosphoryliertem Rb zeigen (vgl. Kapitel 4.3, Abbildung 25). Der Mechanismus auf dem dieses Phänomen beruht, ist noch nicht abschließend geklärt: Es existiert eine Bindungsstelle für E2F in der Rb Promotorregion^[226, 227] und *in vitro* Daten deuteten darauf hin, dass E2F an dieser Promotorregion bindet und zur Aktivierung dieses Promotors führt^[226]. Dies könnte erklären, warum nach Dephosphorylierung von ph.Rb durch Abemaciclib, die Transkription von Rb aufgrund verminderter E2F Aktivität verringert wäre. Neuere *in vivo* Studien jedoch zeichnen ein deutlich komplexeres Bild. So führen Mutationen an der E2F Bindungsstelle im Rb-Promotor zu einer verstärkten Expression von Rb, was auf einen hemmenden Einfluss von E2F auf die Rb-Expression hindeutet^[228] und damit der Annahme widerspricht, dass die Hemmung von E2F zu verringerter Rb-Expression führen könnte. In jedem Fall ist unser Verständnis davon, wie die Expression von Rb auf Transkriptionsebene geregelt ist, noch immer sehr unvollständig. Burkhart und Kollegen bestätigten dies 2010 erneut: Sie konnten anhand der Expression von grün fluoreszierendem Protein (GFP) und Rb zeigen, dass Rb sowie seine verwandten Proteine p107 und p130 wahrscheinlich einerseits direkt selbst an der Expressionsregulation von Rb beteiligt sind und diese andererseits kontextabhängig sowohl in positive als auch in negative Richtung beeinflussen können^[229]. Wichtig ist in jedem Fall die Frage, ob die, wie auch immer ausgelöste, verminderte Expression von Rb eine mögliche Limitation in der Wirksamkeit und damit einen natürlichen Resistenzmechanismus gegenüber Abemaciclib darstellen könnte^[230].

Neben Rb und ph.Rb waren in den sensiblen Zelllinien Mino und JeKo-1, die Expression von ph.Akt(Ser473) mit einer Ratio zur Kontrolle von 0,13 und 0,21 stark und von ph.Akt(Thr308) mit 0,58 und 0,52 mäßig stark vermindert (Abbildung 27 und Tabelle 12). In der resistenten Zelllinie Granta 519 zeigte sich, wenn überhaupt, eine leichte Zunahme von ph.Akt(Ser473). Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten von Chiron und Mitarbeitern zum CDK4/6-Inhibitor Palbociclib, welcher ebenfalls eine

Dephosphorylierung von Akt in MCL Zellen herbeiführte^[231]. Im Fall von Palbociclib war das höchst wahrscheinlich auf eine verstärkte Expression von Phosphoinositide-3-Kinase-Interacting Protein 1 (PIK3IP1) im prolongierten G1-Arrest zurückzuführen^[231]. PIK3IP1 ist ein negativer Regulator von PI3K und führte dadurch nach Aktivierung zur verminderten Phosphorylierung von Akt^[232]. Dass dies nur in den sensitiven Zelllinien zu beobachten ist ließe sich möglicherweise so erklären: Die verminderte Phosphorylierung von Akt aufgrund verstärkter PIK3IP1-Expression führt, durch die konsekutive Enthemmung von GSK3 β und vermehrte Transkription von endogenen Zellzyklusinhibitoren (s. Kapitel 1.5.2), zu einer verstärkten Wirkung von Abemaciclib in den sensiblen Zelllinien^[140]. Interessanter Weise kam es bei unseren Versuchen zu dieser Dephosphorylierung obwohl wir ebenfalls eine, wenn auch marginale, Verminderung von ph.Rictor(Thr1135) nachweisen konnten (Abbildung 26). Rictor wird an Threonin 1135 von S6K inhibierend phosphoryliert^[233], wodurch der mTORC2 Komplex gehemmt wird, welcher wiederum Akt an Serin 473 aktivierend phosphoryliert (vgl. Kapitel 1.5.2, ^[140]). Diese Entdeckungen bestätigen zum einen Daten von Zhang *et al.*, in denen die Dephosphorylierung von Rb durch CDK4/6-Inhibitoren mit einer verstärkten Phosphorylierung von Akt an Ser473 einherging, mutmaßlich aufgrund einer Enthemmung von mTORC2^[234]. Zum anderen war in den Lymphomzellen die Dephosphorylierung von Rictor mit eventuell resultierender Enthemmung von mTORC2 jedoch nicht ausgeprägt genug, um einen spürbaren Effekt auf die Akt-Phosphorylierung auszuüben. Die Daten von Zhang *et al.* beruhen auf Versuchen an Zelllinien von soliden Tumoren (U2OS, Osteosarkom und MDA-MB, Mamma-Ca.) und sind deswegen möglicherweise nicht direkt übertragbar auf lymphatische Neoplasien. Wir konnten demnach zeigen, dass bei allen Zelllinien, auch bei der resistenteren Granta 519, Rb und ph.Rb nach Abemaciclib-Behandlung deutlich in ihrer Expression reduziert waren, ph.Akt jedoch nur in den sensitiven Zelllinien. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Dephosphorylierung von Rb alleine nicht ausreichend ist, um eine suffiziente Proliferationshemmung herbei zu führen. Immer mehr Studien deuten darauf hin, dass die Wirkungen von CDK4/6-Inhibitoren nicht nur auf die Hemmung des Zellzyklus durch Rb-Reaktivierung zurückzuführen sind, sondern dass weitere Faktoren, beispielsweise die Transkription von FOXM1, ebenfalls eine Rolle spielen^[235-237].

Wir konnten außerdem zeigen, dass bei Granta 519, im Gegensatz zu den sensitiveren Zelllinien JeKo-1, Maver-1 und Mino, unter Abemaciclib-Therapie MEK1/2 deutlich verstärkt phosphoryliert wurde (Abbildung 27). Zusätzlich stellte sich eine erkennbare Erhöhung von CDK4 nach Abemaciclib-Behandlung bei Granta 519 dar, die bei den sensitiven Zelllinien nicht zu detektieren war (Tabelle 12). Sowohl der MAPK Signalweg als auch verstärkte Expression

von CDK4 wurden bereits mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren in Verbindung gebracht^[238-240]. Diese Daten suggerieren also, dass die verminderte Sensitivität von Granta 519 gegenüber Abemaciclib ebenfalls durch eine reflektorische Erhöhung dieser Signalwege herbeigeführt worden sein könnte. Anders als beispielsweise bei der intrinsisch resistenten DLBCL Zelllinie U2932, in der wir in Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen^[241], keinerlei Rb-Expression detektieren konnten (Daten nicht gezeigt), könnte es sich damit bei Granta 519 eher um adaptive Resistenz handeln^[242, 243]. Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um abschließend zu klären, welche Faktoren bei der verminderten Sensitivität von Granta 519 im Gegensatz zu den anderen MCL Zelllinien eine Rolle spielen und ob die Dephosphorylierung von Akt nur Ausdruck von oder auch mitverantwortlich für die erhöhte Sensitivität gegenüber Abemaciclib ist.

5.2. Die Wirkung Abemaciclibs auf weitere molekulare Ziele

Gelbert *et al.* zeigten in ihrer Arbeit zur Charakterisierung von Abemaciclib 2014, dass neben der Aktivität gegen CDK4/6 vor allem PIM-1 und CDK9/Cyclin T1 mögliche off-Targets von Abemaciclib sein könnten^[158]. In den zellfreien Enzym-Assays waren die gemessenen IC₅₀-Konzentrationen zur Hemmung von PIM-1 und CDK7/Cyclin T1 mit je 50 nM und 57 nM jedoch weit über den gemessenen IC₅₀-Konzentrationen für CDK4 und 6 (2 und 9,9 nM)^[158]. Unsere Daten bestätigen in den Zelllinien JeKo-1 und Mino eine deutliche Reduzierung der PIM-1-Expression nach Abemaciclibbehandlung (s.o.). Dies lag aber wahrscheinlich nicht an einer direkten PIM-1 Hemmung, sondern an einer Reduktion von PIM auf Transkriptionsebene: PIM 1, 2 und 3 werden physiologischer Weise durch Translation und Transkription reguliert^[244] und die direkte Hemmung von PIM ist vor allem an der Dephosphorylierung der PIM Zielenzyme zu erkennen. Einige jüngst veröffentlichte Arbeiten zeigen zwar, dass PIM-Inhibitoren auch zur verminderten Expression von PIM selber führen können, wie ist jedoch weitgehend ungeklärt^[245, 246]. Hinzu kommt, dass Abemaciclib keinerlei Auswirkungen auf die Viabilität und Apoptose der Zellen zeigte. Auch auf molekularer Ebene ließ sich keine Zunahme an Apoptosemarkern wie cleaved PARP^[247] nachweisen (Daten nicht gezeigt). Dies steht ebenfalls in einer gewissen Dissonanz zu den bestehenden Daten zu PIM-Inhibitoren. Es existieren zwar Studien, in denen von einer eher geringen Auswirkung der PIM-Inhibitoren auf das Überleben der Tumorzellen berichtet wird^[248], andere Arbeitsgruppen zeigen jedoch eine deutlich messbare Zunahme apoptotischer Zellen nach PIM-Inhibition^[245, 246, 249]. Wahrscheinlicher als durch die direkte Hemmung von PIM-1, ist bei uns die Reduktion von PIM-1 durch einen Mechanismus analog zu Palbociclib zu erklären: Bei Palbociclib kommt

es durch Hemmung der Expression des Homeobox A9 (HOXA9) Onkogens, zur verminderten Transkription von PIM-1^[215].

Ein gewisser Effekt von Abemaciclib auf die Aktivität oder Expression von PIM-1 ist also nicht vollständig auszuschließen, es sind aber weitere Untersuchungen, zum Beispiel zur Wirkung von Abemaciclib auf die HOXA9-Expression notwendig, um das Ausmaß und die zugrundeliegenden Mechanismen besser zu verstehen.

5.3. MCL sprechen aufgrund von Cyclin D1-Überexpression besser auf Abemaciclib an als DLBCL

Maligne Erkrankungen entstehen durch aberrante Proliferation, sei es durch den Verlust von Tumorsuppressoren oder die verstärkte Aktivität von Onkogenen. Der wichtigste Schritt in der Onkogenese und damit auch das Kennzeichen des Mantelzelllymphoms ist die Translokation t(11;14)(q13;q32), wodurch es zu einer Überexpression von Cyclin D1 kommt^[16]. Es ist also anzunehmen, dass das MCL insgesamt besser auf die Therapie mit CDK4/6-Inhibitoren anspricht, als andere Lymphome. Daten zu Palbociclib bestätigen dies größtenteils: Bei MCL Zelllinien wird eine deutliche Wirkung bereits bei Konzentrationen bis 100 nM erreicht^[224], wohingegen in DLBCL Zelllinien IC₅₀-Konzentrationen zwischen 12 und 20 µM gemessen wurden^[250]. In Übereinstimmung damit wird aus Abbildung 6, Abbildung 10 und Abbildung 11 unserer Daten deutlich, dass MCL Zelllinien ebenfalls auf die Inhibition des Cyclin D-CDK4/6-Komplexes durch Abemaciclib besser ansprechen, als DLBCL Zelllinien. Die naheliegendste Erklärung ist, dass es beim DLBCL nur in einem sehr viel geringeren Teil der Patienten zur Überexpression von Cyclin D oder CDK4/6 kommt. Zlamalikova und Kollegen untersuchten beispielsweise 30 Patienten mit MCL und 104 Patienten mit DLBCL auf die Cyclin D-Expression der malignen Zellen^[251]. Hierbei zeigte sich lediglich bei etwa 10 % der Patienten mit DLBCL eine Überexpression von Cyclin D2 ohne Veränderungen in der Cyclin D1- oder D3-Expression. Im Gegensatz dazu waren von den 30 MCL Patienten 29 Patienten von Cyclin D1- und zwei Patienten von Cyclin D2-Überexpression betroffen. Eine andere, etwas kleinere Studie fand bei 15-18 % der 77 untersuchten DLBCL Patienten eine Expression von Cyclin D1, wobei diese in den meisten Fällen gering ausfiel^[252]. Wahrscheinlich sind also beim DLBCL nicht Cyclin D1, sondern Cyclin D2 und D3 verstärkt exprimiert^[253]. In der Tat stellten Metcalf und Mitarbeiter bei fast 50 % der DLBCL Patienten anhand von immunhistochemisch gefärbten Microarrays eine Expression von Cyclin D2 und bei immerhin 20 % eine Expression von Cyclin D3 fest^[254]. Allerdings war auch hier die Expression in den

meisten Fällen schwach und vergleichbar mit der in gesundem Gewebe. Darüber hinaus zeigte die Cyclin D-Expression keine Korrelation zu einer erhöhten Proliferationsrate.

Neben der Überexpression von Cyclin D sind die Überexpression von CDK4 und CDK6 oder die Verminderung von deren natürlichem Inhibitor p16^{INK4A} möglicherweise nachvollziehbare Biomarker für CDK4/6-Inhibitorsensibilität^[230]. Beim DLBCL wurde eine Überexpression von CDK4, vor allem beim GCB Typ, in bis zu 20 % der Fälle nachgewiesen und weitere zellzyklusassoziierte Veränderungen wie Amplifikationen von CDK6 oder eine verminderte Expression der Inhibitoren p16^{INK4A} oder p27^{KIP1} konnten bei einem geringen Teil der Patienten ebenfalls festgestellt werden^[255-257]. Allerdings war etwa die Überexpression von CDK4 alleine nicht mit einem Unterschied im Gesamtüberleben assoziiert^[255]. Darüber hinaus gibt es widersprüchliche Daten zu den CDKs als Biomarker. Einige Autoren berichten über eine gute Sensitivität von Zellen mit CDK4-Amplifikation gegenüber CDK4/6-Inhibitoren^[258, 259], wohingegen ebenfalls Hinweise darauf bestehen, dass die Überexpression von CDK4 mit einer erhöhten Resistenz gegenüber CDK4/6-Inhibitoren assoziiert sein könnte^[239, 240].

Ein weiterer, bereits seit längerem bekannter Mechanismus, über den es zu erhöhter Resistenz gegenüber CDK4/6-Inhibitoren kommen kann, ist die Bildung von Cyclin D1/CDK2 Komplexen^[94, 242, 260]. Malumbres und Kollegen konnten 2004 beispielsweise zeigen, dass CDK4/6 doppelt negative Mäuse zwar in Phasen der späten Embryogenese an einem deutlichen Defizit aller hämatopoetischen Reihen sterben und damit nicht viabel sind, sie jedoch eine weitgehend normale Organogenese vorweisen. Außerdem haben CDK4/6 doppelt negative Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) eine fast normale, wenn auch verlangsamte Proliferationsfähigkeit^[260]. Dies beruhte höchstwahrscheinlich zumindest teilweise auf der Phosphorylierung von Rb durch Cyclin D/CDK2 Komplexe, welche in CDK4/6 doppelt negativen MEFs, im Vergleich zu wildtyp MEFs, deutlich erhöht waren. Eine Möglichkeit, dies zu umgehen, wäre die zusätzliche Inhibition von CDK2, die Erfahrung mit den früheren Pan-CDK-Inhibitoren zeigt aber, dass klinisch, aufgrund der eingeschränkten Wirksamkeit und relativ hohen Toxizität, eine zusätzliche Hemmung mehrerer weiterer CDKs eher nicht in Frage kommt^[261]. Es ist also wichtig und vor dem Hintergrund möglicher Resistenzen notwendig, sinnvolle Kombinationen verschiedener Medikamente zu testen (vgl Refs: ^[214, 231, 242, 262]).

5.4. Die Kombination von Abemaciclib mit Inhibitoren des BCR Signalweges ist synergistisch

Die Kombination verschiedener (Chemo-)Therapeutika zur Verbesserung der Wirksamkeit und Vorbeugung von Resistenzen hat in der Tumorthherapie bereits lange Tradition^[263]. Ibrutinib ist ein mittlerweile zur Therapie von MCL zugelassener Btk-Inhibitor^[159] und hemmt damit eine zentrale Schaltstelle des B-Zell Rezeptor Signalweges^[106, 110, 115, 140]. Es gilt als ziemlich sicher, dass der BCR Signalweg eine Schlüsselrolle in der Pathogenese vieler unterschiedlicher Lymphome hat^[264]. Sowohl bei der CLL als auch beim FL und beim DLBCL kommt es über unterschiedliche Mechanismen zu einer verstärkten Aktivierung des B-Zell Rezeptor Signalweges^[265-267]. Es kommt zur verstärkten Erkennung von Antigenen oder sogar zur Autostimulation durch die Erkennung von Epitopen des BCR bei der CLL^[266, 268], zur konstitutiven Erhöhung von Syk beim FL^[267] oder zu Mutationen von CD79A/B beim DLBCL^[265]. Auch beim MCL konnte die Bedeutung des BCR gezeigt werden: Einerseits kommt es häufig zur verstärkten Aktivierung von mit dem BCR assoziierten Signalwegen wie dem Akt oder NF- κ B Signalweg^[16, 269], andererseits ist aufgrund großer Gemeinsamkeiten in den IGHV-Regionen vieler MCL, ähnlich der CLL, ein Antigen-getriebener und somit BCR-abhängiger pathogenetischer Ursprung wahrscheinlich^[270]. Diese pathogenetischen Überlegungen werden durch den großen klinischen Erfolg, vor allem des Btk-Inhibitors Ibrutinib und anderen Inhibitoren des BCR Signalweges, bei der Behandlung von Lymphomen bestätigt^[6, 159, 271].

Es war also naheliegend, den CDK4/6-Inhibitor Abemaciclib mit einem Inhibitor des BCR Signalweges zu kombinieren und hierbei in erster Linie mit dem bereits relativ etablierten Btk-Inhibitor Ibrutinib anzufangen. Chiron *et al.* konnten bereits für Palbociclib zeigen, dass durch einen prolongierten G1-Arrest mögliche Ibrutinib-Resistenzen durch Induktion von PIK3IP1 überwunden werden können^[214, 231]. In primär Ibrutinib-resistenten Patienten war nicht eine fehlerhafte Btk-Hemmung, sondern wahrscheinlicher eine erhöhte Aktivierung von PI3K/Akt die Ursache^[214]. Aufgrund der Dephosphorylierung von Akt durch Abemaciclib (vgl. [Tabelle 12](#); [Abbildung 27](#)) ist dies ein weiteres Argument für die Kombination beider Medikamente. Unsere Daten zeigten in Übereinstimmung mit diesen Überlegungen, dass es möglich ist, vor allem durch die sequenzielle Kombination von Abemaciclib-induziertem G1-Arrest und darauffolgender Ibrutinibbehandlung einen Synergismus in zwei von den drei sensiblen Zelllinien (JeKo-1, Maver-1) und additive Effekte bei Mino zu erreichen (vgl. [Abbildung 14](#); [Tabelle 6](#)). Die Daten zu Granta 519 sind aufgrund des sehr geringen Effektes beider Inhibitoren in den verwendeten Konzentrationen und den damit verbundenen hohen rechnerischen

Schwankungen bei kleinsten Unterschieden nicht als Synergismus oder Antagonismus zu interpretieren. Anhand von Abbildung 14 ließe sich argumentieren, dass die graphisch dargestellten Unterschiede zwischen Ibrutinib alleine und der Kombination aus Abemaciclib und Ibrutinib ebenfalls recht gering waren – bei Maver-1 etwa war selbst bei Abemaciclib mit 5 μ M Ibrutinib die IC₅₀ nicht erreicht. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass bedingt durch den Versuchsaufbau, nur die Effekte von 24 h Ibrutinib, beziehungsweise Ibrutinib plus G1-Arrest in der Grafik dargestellt wurden. Denn nach 32 h Abemaciclib und vor Ibrutinibbehandlung wurden alle Zellen wieder auf die gleiche Konzentration gebracht. Analog zu den Versuchen für Abemaciclib alleine ist es also möglich, dass nach 24 h aufgrund reduzierter Wachstumszeiten, noch kein so deutlicher Effekt nachweisbar war wie nach 48 oder 72 h (s.o.). Beim CellTiter-Glo ist jedoch die ATP-Messung nur bis zu einer bestimmten Zellzahl pro Well linear zur Anzahl viabler Zellen^[202]. Nach Berechnung der *combination Indices* konnte bereits nach 24 h ein deutlicher Effekt festgestellt werden (vgl. Tabelle 6), weshalb die recht kurze Inkubationszeit von 24 h gewählt wurde.

Die synchrone Behandlung von MCL Zellen mit Abemaciclib und Ibrutinib ergab im Gegensatz dazu hauptsächlich additive Kombinationseffekte (vgl. Tabelle 5). Allerdings ließ sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich der mit unterschiedlich hohen Konzentrationen Abemaciclib behandelten Zellen feststellen. Die niedrigere Dosierung zeigte dabei im Schnitt höhere und vor allem positive Werte. Einige Autoren zählen bereits Werte über 0 als Synergismus und Werte unter 0 als Antagonismus^[272], und nach dieser Lesart ergeben sich einige interessante Überlegungen: Es ist bereits sehr lange bekannt, dass wenn zwei unterschiedlich potente Pharmaka an derselben Stelle binden, antagonistische Wirkungen die Folge sind^[263]. Möglicherweise konkurriert Abemaciclib in der höheren Konzentration bereits an einem geringen Teil der Bindungsstellen mit Ibrutinib und schwächt dadurch dessen Wirkung. Eine andere Erklärung wären reflektorische Veränderungen in der Proteinexpression durch Feedbackmechanismen^[273]. Im Western-Blot zeigte sich beispielsweise eine Erhöhung der Expression von sowohl Cyclin D1 als auch Btk nach 8 h bei der Kombinationsbehandlung in den sensitiven Zelllinien JeKo-1, Maver-1 und Mino (vgl. Tabelle 12), welche sich nach 24 h wieder normalisierte. Möglicherweise hält der Effekt bei höheren Abemaciclib Konzentrationen länger an, was zu dem etwas schlechteren Ergebnis der Kombination von 250 nM Abemaciclib mit Ibrutinib im Vergleich zu 31,25 nM Abemaciclib mit Ibrutinib führen könnte. Eine reflektorische Hochregulation oder eine Disinhibition sind häufig beobachtete Mechanismen bei Medikamentenresistenzen: Die kompensatorische Steigerung der Aktivität des PI3K/Akt Signalweges beispielsweise wurde schon mehrfach für erworbene Resistenzen

gegenüber mTOR-Inhibitoren wie Everolimus verantwortlich gemacht^[274-276]. Warum diese Hochregulation, vor allem von Btk, jedoch hauptsächlich bei Kombinationstherapie und weniger unter Abemaciclib alleine geschieht, lässt sich anhand dieser Überlegungen nicht erklären. Unseres Wissens nach wurde ein dosisabhängiger Zusammenhang der Wirksamkeit von CDK4/6-Inhibition in Kombination mit Ibrutinib in dieser Form noch nicht beschrieben. Was der zugrundeliegende Mechanismus ist und ob dies an noch unbekanntem off-Target Effekten oder feedback Schleifen von Abemaciclib bei 250 nM liegen könnte, bleibt zu untersuchen.

Das gute Zusammenspiel beider Inhibitoren, wird auf molekularbiologischer Ebene deutlich, wenn man die Hauptziele beider Inhibitoren sowohl alleine als auch in Kombination betrachtet. Wie bereits beschrieben, führte Abemaciclib zu einer starken Dephosphorylierung und Runterregulation von Rb, ohne die Expression von CDK4, Cyclin D1 und CDK2 signifikant zu beeinflussen (Abbildung 25, Tabelle 12). Außerdem kommt es bei den sensitiven Zelllinien zu einer zusätzlichen Dephosphorylierung von Akt an Ser473 und in geringerem Maße auch an Thr308 (Abbildung 27). Ibrutinib führte, wie bereits vielfach gezeigt^[277, 278], zu einer starken Dephosphorylierung von Btk an Stelle Tyr223 bei größtenteils erhaltener Btk-Expression. Darüber hinaus stellten wir bei Analyse der Expression des eigentlich upstream von Btk gelegenen Syk^[106], ebenfalls eine deutliche Dephosphorylierung an Stelle Tyr352 fest (Abbildung 28). Die Effekte von Abemaciclib und Ibrutinib lassen sich fast überall jeweils sowohl bei der Einzeltherapie als auch in Kombination nachweisen (Tabelle 12), was dafür spricht, dass in den gewählten Kombinationen beide Inhibitoren potent die vorgesehenen Signalwege hemmen, ohne negativ miteinander zu interagieren. Interessanterweise ist die einzige Ausnahme ph.Akt: Es ist nach 24 h unter Abemaciclib-Einzeltherapie bei den Zelllinien JeKo-1 und Mino deutlich reduziert, wird bei der Kombination von Abemaciclib und Ibrutinib jedoch nur bei JeKo-1 vermindert exprimiert (s.o.). Es ist verlockend zu spekulieren, ob dies in Zusammenhang damit stehen könnte, dass für die sequenzielle Behandlung mit Abemaciclib und Ibrutinib bei JeKo-1 ein Synergismus, bei Mino jedoch ein additiver Kombinationseffekt nachweisbar war (vgl. Tabelle 6). Wenn auch noch sehr präliminär, so sind diese Daten doch in Zusammenschau damit, dass die resistente Zelllinie Granta 519 auch in Einzeltherapie keine Akt-Dephosphorylierung aufweist, ein weiterer Hinweis darauf, dass Akt möglicherweise ein wichtiger Prädiktor für die Wirksamkeit von Abemaciclib sein könnte.

Die Kombinationen von Abemaciclib induziertem G1-Arrest mit anderen Inhibitoren des BCR Signalweges ergaben in präliminären, sondierenden Versuchen additive bis bestenfalls leicht synergistische Effekte (vgl Kapitel 4.2.3). Dies sollte jedoch nicht als Unwirksamkeit der

Kombinationen interpretiert werden, sondern vielmehr dazu anregen, zu hinterfragen, warum beispielsweise bei der Zelllinie JeKo-1, nicht aber bei den anderen Zelllinien der PI3K α/δ -Inhibitor Copanlisib synergistisch mit Abemaciclib interagiert (Tabelle 9). Möglicherweise gilt außerdem auch hier, dass die Inkubationszeiten von 24 h nach Inhibitor Gabe zu kurz gewählt worden waren, um deutliche Unterschiede in den Effekten zwischen Einzel- und Kombinationsbehandlung erkennen zu können.

5.5. Hemmung von Btk und weiteren Kinasen der Tec-Familie führt zu Syk Dephosphorylierung

Bei Behandlung der Zellen mit Ibrutinib und der Kombination Abemaciclib / Ibrutinib zeigt sich ein deutlicher Verlust von ph.Zap70/Syk (Abbildung 28). Die Expression von nicht phosphoryliertem Syk sowie des downstream Effektors PLC γ 2 blieben durchweg konstant, was auf eine Regulation auf Aktivierungsebene ohne Einfluss auf die Transkription hinweist (Abbildung 28, Daten nicht gezeigt). Zusammengenommen könnte dies ein Indiz für einen möglichen positiven Feedbackmechanismus sein, in dem Btk seine eigene Aktivierung, durch direkte oder indirekte Phosphorylierung von Syk, verstärken könnte. Es gibt bisher nur sehr wenige Studien, die ebenfalls von einer verminderten Syk-Phosphorylierung nach Ibrutinib-Therapie berichten^[279, 280] und von diesen wenigen versucht nur die Arbeitsgruppe um Manne eine Erklärung für diese Beobachtung zu finden^[279]. Manne *et al.* ziehen in ihrer Arbeit den Schluss, dass Syk in Thrombozyten möglicherweise überhaupt erst durch Btk und andere Tec Kinasen phosphoryliert und dadurch aktiviert wird. Diese und unsere Daten stehen im Gegensatz zu anderen Studien, in denen der Effekt von Ibrutinib auf Syk nicht (oder nicht so stark) ausgeprägt war^[172, 281] oder nicht untersucht wurde^[282, 283]. Sieht man sich allerdings Figure 2A aus Ref.^[281] genau an, so lässt sich bei den DT40 Zellen mit induzierter wildtyp PLC γ 2 ebenfalls eine leichte Dephosphorylierung von Syk unter Ibrutinib erahnen, die bei mutiertem PLC γ 2 nicht zu erkennen ist. Sollten sich diese Beobachtungen in weiteren Studien bestätigen, spräche das für einen indirekten positiven Feedbackmechanismus, in den zumindest die PLC γ 2 mit integriert ist. Auf jeden Fall weisen diese Daten in Zusammenschau mit unseren Ergebnissen auf einen weiteren, bisher weitgehend unbekanntem Mechanismus in der Regulation des B-Zell Rezeptor Signalweges hin.

5.6. Abemaciclib hat sequenzspezifische Wechselwirkungen mit Cytarabin beim MCL

Verschiedene Studien setzten sich bereits mit der Frage auseinander, ob durch Kombination von klassischen Zytostatika mit CDK4/6-Inhibitoren eine Wirkungsverstärkung oder Dosisreduktion der Zytostatika erreicht werden könnten^[219]. Arbeiten der Gruppe um Chen-Kiang zur AML und zum Multiplen Myelom beispielsweise, lieferten sehr interessante Resultate indem sie den reversiblen, nicht-toxischen Charakter von Palbociclib auf unkonventionelle Art und Weise geschickt ausnutzten. Durch S-Phase-Synchronisation der Tumorzellen mittels Palbociclib konnten sie *in vitro* und *in vivo* eine erhebliche Wirkungssteigerung von Cytarabin erreichen^[215, 284]. Unsere Ergebnisse zeigten nun, dass es ebenfalls beim MCL mit Abemaciclib möglich ist, durch dessen sequenzielle Kombination mit Cytarabin eine deutliche Erhöhung des zytotoxischen Effektes herbeizuführen. In Mino und JeKo-1 Zellen konnte durch S-Phase Synchronisation mittels Abemaciclib sequenzspezifisch ein starker Synergismus mit signifikanter Steigerung toter und apoptotischer Zellen, sogar über den additiven Effekt beider Wirkstoffe hinaus, erzielt werden (Abbildung 19). Da Abemaciclib alleine keinerlei zytotoxische Wirkung zeigte (Abbildung 7; Abbildung 12), konnten wir davon ausgehen, dass jegliche zusätzliche Toxizität auf die Kombination von Abemaciclib-induzierter S-Phase Synchronisation mit AraC zurückzuführen war.

Darüber hinaus konnten wir allerdings feststellen, dass die Cytarabin-Wirkung bei Therapie unter anhaltendem G1-Arrest deutlich abgeschwächt war. Der Antagonismus bei synchroner Behandlung war sogar noch deutlicher ausgeprägt als der Synergismus nach S-Phase Synchronisation. Bei allen getesteten Zelllinien ließ sich eine starke Protektion der Tumorzellen durch den persistierenden G1-Arrest gegenüber der Cytarabin-Therapie beobachten (Abbildung 17 B, Tabelle 8). Dies bestätigte sich ebenfalls bei durchflusszytometrischer Charakterisierung der Zellen: Es kam zu einer signifikanten Abnahme an apoptotischen (beziehungsweise toten) Zellen mit entsprechender Zunahme viabler Zellen in der Gruppe Abemaciclib / Cytarabin ohne Wash-out im Vergleich zu Cytarabin alleine (Abbildung 19 B und C). Diese Ergebnisse werden von Daten zu Palbociclib beim Mammakarzinom^[285] und zu Cytarabin-Resistenz durch Bortezomib-induziertem G1-Arrest in der AML^[286] bestätigt. Sie stehen jedoch in scheinbarem Widerspruch zur Publikation von Gelbert *et al.*, in der ein positiver Kombinationseffekt von simultaner Abemaciclib- und Gemcitabin-Therapie postuliert wurde^[158]. Gemcitabin ist strukturell ein leicht verändertes Analogon von Cytarabin und entfaltet seine zytotoxische Wirkung ebenfalls primär durch Hemmung der DNA-Synthese, also in der S-Phase^[287]. Anders als bei Cytarabin, ist die Gemcitabin-Wirkung jedoch nicht auf die DNA-Synthesehemmung

beschränkt; Gemcitabin hemmt beispielsweise auch die RNA-Synthese^[287]. Möglicherweise existieren bisher nur ungenügend bekannte weitere Mechanismen, die dazu führen, dass unter anderem die Cytarabin-, nicht aber die Gemcitabin-Wirkung durch einen potenten G1-Arrest abgeschwächt wird. Gelbert *et al.* postulieren beispielsweise, dass RRM1, ein Gen welches mit Gemcitabin-Resistenz in Verbindung gebracht wird^[287], unter Abemaciclib dosisabhängig runterreguliert sein könnte^[158].

Die für uns überraschenden Ergebnisse zur Kombination von Abemaciclib mit dem Bcl-2-Inhibitor Venetoclax zeigten darüber hinaus, dass antagonistische Effekte nicht nur bei den klassischen Zytostatika zu erwarten sind: In drei der vier untersuchten Zelllinien zeigte sich ähnlich dem, was bei Cytarabin zu beobachten war, überwiegend ein Antagonismus (Tabelle 10). Diese Daten sind jedoch äußerst präliminär und hier eine Erklärung dafür zu finden ist darum schwierig. Da der antiapoptotische Effekt von Bcl-2 Proteinen zumindest teilweise auf einem durch Bcl-2vermittelten Zellzyklusarrest beruht^[288], wäre es zwar theoretisch denkbar, dass der Antagonismus durch komplexe Interaktionen in der Zellzyklusregulation beider Inhibitoren, zustande kommt. Dagegen spricht jedoch, dass wir durchflusszytometrisch keinen nennenswerten Einfluss einer Einzeltherapie mit Venetoclax auf den Zellzyklus feststellen konnten (Daten nicht gezeigt).

Zusammengenommen bedeuten diese Daten, dass Abemaciclib (und CDK4/6-Inhibitoren allgemein) einerseits sehr gut zur Kombinationstherapie geeignet ist, wahrscheinlich auf Dauer sogar nur in Kombination wirksam sein kann. Andererseits müssen jedoch geplante Kombinationen aufgrund von Antagonismen und Interaktionen sehr gewissenhaft präklinisch untersucht werden, bevor man zu einer klinischen Testung übergeht.

5.7. Primäre Zellen sind nicht immer das Modell der ersten Wahl in Zellkultur

Die Arbeit an Zelllinien unterliegt einigen Einschränkungen^[289]. Zelllinien haben durch die Immortalisierung teilweise stark vom Ursprungstumor divergente Proteinexpressionsmuster, was die Interpretation der Ergebnisse erschweren kann^[290, 291]. Die von uns untersuchten Zelllinien exprimieren beispielsweise CDK4 deutlich stärker als CDK6 (Daten nicht gezeigt), obwohl physiologischerweise in lymphatischen Geweben hauptsächlich CDK6, nicht CDK4 exprimiert wird^[211, 292]. Darum wird häufig auf die Verwendung von primären Zellen zur Validierung der an Zelllinien gewonnenen Ergebnisse zurückgegriffen^[289, 291]. Bei der Validierung unserer Daten an primären Zellen wurde jedoch deutlich, dass auch primäre Zellen

nicht in jedem Zusammenhang das ideale Mittel darstellen. Wir konnten zeigen, dass sich zum Zeitpunkt der Analyse so gut wie alle primären Zellen, auch die unbehandelten, in G1/G0-Phase befanden (Abbildung 24 C, D). Abemaciclib und Cytarabin wurden dadurch die Hauptangriffspunkte genommen, was eine eingeschränkte Wirksamkeit beider Medikamente einerseits alleine und andererseits in Kombination, zur Folge hatte (Abbildung 24). Primäre Zellen sind also aufgrund ihres limitierten Proliferationspotentials kein Modell der ersten Wahl zur Testung von Zellzyklusabhängigen Substanzen.

Anderes verhielt es sich mit Ibrutinib: Eine Studie von Ma *et al.* an 16 primären Spender- und MCL Zellproben demonstrierte beispielsweise, dass primäre Zellen von gesunden Probanden deutlich weniger Btk exprimieren als primäre MCL Zellen, und dass innerhalb der MCL Patienten das Ansprechen gegenüber Ibrutinib stark variierte^[277]. Sie konnten darüber hinaus zeigen, dass dies mit Unterschieden in der Phosphorylierung von Proteinen downstream von Btk, wie Akt und ERK, zusammenhängt^[277]. Wir konnten diese Beobachtungen an unseren Proben größtenteils bestätigen. Ibrutinib hatte auf die Lymphozyten eines gesunden Spenders nur minimalen Einfluss, wohingegen die primären Patientenzellen sehr unterschiedlich gut auf Ibrutinib ansprachen (Abbildung 22 A, Abbildung 23).

5.8. Methodische und andere Einschränkungen dieser Arbeit

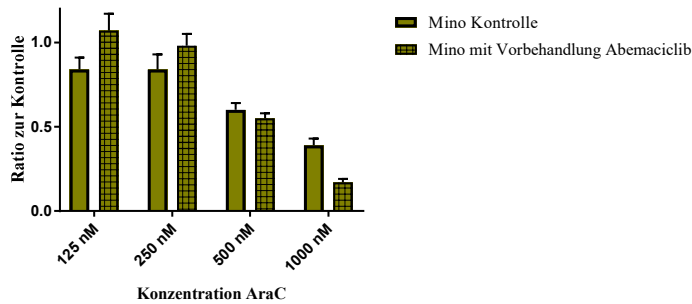
Alle wissenschaftlichen Arbeiten unterliegen gewissen Einschränkungen, die bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden müssen. Diese können zum Beispiel methodischer Art sein, durch die Nutzung von simplifizierten Modellsystemen oder statistischer Art, durch eine Vielzahl an möglichen Variationen in der Auswertung der gemessenen Daten. Ein methodischer Aspekt, der in den letzten Jahren immer mehr in Fokus gerückt ist und in dieser Arbeit größtenteils außer Acht gelassen wurde, ist der Einfluss des Tumor Mikromilieus, bestehend aus Stroma und infiltrierenden Immunzellen^[293]. Der Großteil unserer Ergebnisse ist jedoch mit einer Vielzahl an Studien zu anderen CDK4/6-Inhibitoren und Tumorentitäten in Einklang zu bringen (s.o.), von denen etliche auch am Mausmodell durchgeführt wurden. Damit können unsere Daten, trotz Außerachtlassung des Tumormikromilieus, mit großer Wahrscheinlichkeit als plausibel angenommen werden. Hinzu kommt, dass die meisten Experimente in unserem Labor ebenfalls an Zelllinien in Kultur mit Feeder-Zellen durchgeführt wurden. Auch diese lieferten kongruente Ergebnisse (unpublizierte Daten). Feeder-Zellen können Wachstumsfaktoren, Zytokine und extrazelluläre Matrixproteine sezernieren, wodurch sie sich in gewissem Maße zur Simulation von natürlichem Stroma eignen^[294].

Neben diesen methodischen Einschränkungen, gibt es einige statistische Überlegungen, die gemacht werden müssen: Betrachtet man beispielsweise die statistische Auswertung der Proteinexpressionsmuster im Western-Blot, so fällt auf, dass nach Korrektur gegen multiples Testen die Expression von ph.Rb und ph.Btk bei Abemaciclib und Ibrutinib keine Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle mehr erreichen konnte (Kapitel 4.3). Dies relativiert jedoch die Ergebnisse nur eingeschränkt. Unter Wissenschaftlern besteht kein einheitlicher Konsens darüber, ob gegen multiples Testen im präklinischen Setting überhaupt kontrolliert werden sollte und einige Autoren gehen davon aus, dass die Kontrolle gegen multiples Testen von Laborexperimentellen Daten zu einer unnötigen Erhöhung des β -Fehlers führt^[295, 296].

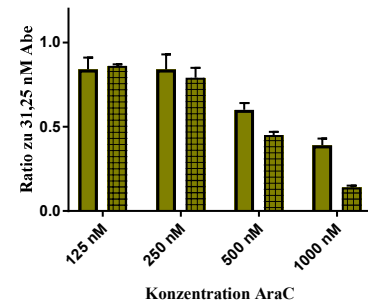
Bei der Berechnung der Medikamentenwirkung der Experimente mit Wash-out muss darüber hinaus beachtet werden, dass die Ratio, auch für die vorbehandelten Zellen, immer zur unbehandelten Kontrolle („Kontrolle U“) gebildet wurde (ab hier „Methode 1“). Diese Berechnung ist jedoch fehleranfällig. Da in der 96-Well Platte je 12000 Zellen pro Well angesetzt wurden und die mit Abemaciclib vorbehandelten Zellen aus einem anderen Well stammten als die Kontrollpopulation (vgl. Abbildung 3), musste die Verdünnung sehr genau pipettiert werden, um belastbare Ergebnisse zu erzielen. Genauer könnte sein, die mit Cytarabin behandelten Zellen, welche mit Abemaciclib vorbehandelt wurden, mit den Zellen zu vergleichen, die zwar mit Abemaciclib vorbehandelt wurden, dann aber keine Cytarabin-Behandlung mehr erhalten haben, da diese Zellen aus demselben Well der 6-Well Platte stammten („Kontrolle A“; ab hier: „Methode 2“). Auch diese Rechnung hat aber Schwächen: Aufgrund der Synchronisation durch Abemaciclib könnten die Zellen nach Wash-out einen Wachstumsschub durch den gleichzeitigen Eintritt aller Zellen in die S-Phase erhalten (vgl. Abbildung 15). Das führt möglicherweise zur beschleunigten Verdopplung der „Kontrolle A“ Zellen. Da anschließend die Zahl der stark proliferativen „Kontrolle A“ Zellen ins Verhältnis zu den mit Cytarabin behandelten Zellen gesetzt werden würde, bestünde die Gefahr, die Cytarabin-Wirkung zu überschätzen. Um dies zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit ausschließlich „Methode 1“ zur Berechnung der Kombinationseffekte verwendet. Die Unterschiede, die durch die beiden unterschiedlichen Berechnungen entstünden sind zur Veranschaulichung in Abbildung 29 dargestellt.

A) Wash-out

Mino behandelt mit 62,5 nM Abemaciclib und AraC:
Wash-out nach 24 h



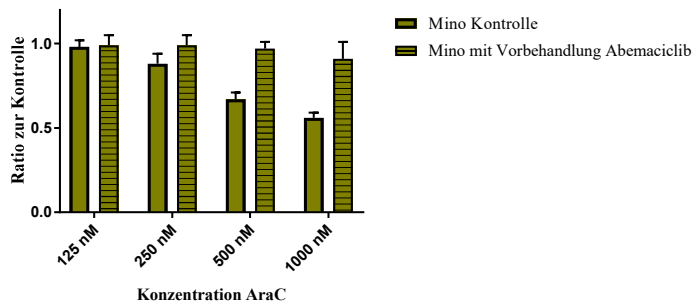
Mino behandelt mit 62,5 nM Abemaciclib und AraC:
Wash-out nach 24 h



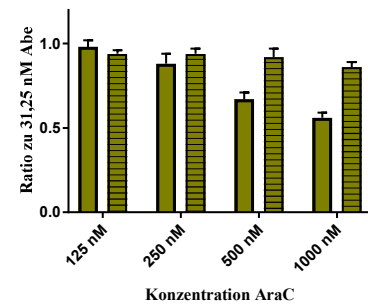
Konzentration AraC:	125 nM	250 nM	500 nM	1000 nM
CI Methode 1	-0,03	0,06	0,19	0,31
CI Methode 2	0,18	0,25	0,29	0,35

B) Kein Wash-out

Mino behandelt mit 62,5 nM Abemaciclib und AraC:
kein Wash-out nach 24 h



Mino behandelt mit 62,5 nM Abemaciclib und AraC:
kein Wash-out nach 24 h



Konzentration AraC:	125 nM	250 nM	500 nM	1000 nM
CI Methode 1	0,04	-0,06	-0,26	-0,32
CI Methode 2	0,09	-0,01	-0,21	-0,27

Abbildung 29: Vergleich der Methoden 1 (jeweils links) und 2 (jeweils rechts) zur Darstellung des Wash-out Effekts bei Kombination von 62,5 nM Abemaciclib mit Cytarabin bei der Zelllinie Mino. A): Ansatz mit Wash-out. Zellen wurden mit 62,5 nM Abemaciclib für 24 h inkubiert. Anschließend wurde der Inhibitor ausgewaschen und nach 8 h Cytarabin in aufsteigender Konzentration hinzugegeben. Hier ist ein deutlicher Synergismus vor allem in den beiden höheren Dosen bei beiden Methoden zu erkennen. Lediglich bei 125 und 250 nM Cytarabin zeigt der CI mithilfe Methode 2 bereits einen Synergismus an, wo bei Methode 1 noch additive Effekte angenommen werden. B) Ansatz ohne Wash-out. Zellen wurden für 32 h mit Abemaciclib inkubiert und anschließend mit Cytarabin in aufsteigender Konzentration behandelt. Auch hier unterscheiden sich die beiden Methoden in der Berechnung nicht wesentlich. Interessant ist der sehr ausgeprägte Antagonismus bereits bei 500 nM Cytarabin. Triplikate nach mind. zwei unabhängigen Passagen, Fehlerbalken zeigen SD.

5.9. Schlussfolgerung

In Zusammenschau aller Daten konnten wir zeigen, dass Abemaciclib beim Mantelzelllymphom ein potenter Zellzyklusinhibitor ist, der zu einem nicht-toxischen, reversiblen G1-Arrest führt. Abemaciclib alleine wirkt damit zytostatisch, weshalb es wichtig ist sinnvolle, rationale Kombinationstherapien zu entwickeln. Dabei muss besonders auf

mögliche zellzyklusabhängige Wirkungen der Kombinationspartner geachtet werden, um unerwünschten antagonistischen Effekten vorzubeugen. Wir konnten zeigen, dass in der sequenziellen Therapie von Abemaciclib und Ibrutinib sowie Abemaciclib und Cytarabin großes Potential steckt und dass diese Kombinationen möglicherweise neue Chancen und Möglichkeiten in der Behandlung des Mantelzelllymphoms bieten könnten. Weitere Studien sind jetzt nötig, um die Interaktionen von Abemaciclib in Kombination mit neuen zielgerichteten Therapien, vor allem des B-Zell Rezeptor Signalweges, und klassischen Therapieregimen besser verstehen und nutzen zu können.

6. Referenzen

1. 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.
2. Dreyling, M., et al., *Mantelzell-Lymphome*, in *Maligne Lymphome*, M. Dreyling, Editor. 2015, Tumorzentrum München: München. p. 91-101.
3. Cortelazzo, S., et al., *Mantle cell lymphoma.* Crit Rev Oncol Hematol, 2012. **82**(1): p. 78-101.
4. Laurent, C., et al., *Impact of Expert Pathologic Review of Lymphoma Diagnosis: Study of Patients From the French Lymphopath Network.* J Clin Oncol, 2017. **35**(18): p. 2008-2017.
5. Herrmann, A., et al., *Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma.* J Clin Oncol, 2009. **27**(4): p. 511-8.
6. Dreyling, M., et al., *Ibrutinib versus temsirolimus in patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: an international, randomised, open-label, phase 3 study.* Lancet, 2016. **387**(10020): p. 770-8.
7. Martin, P., et al., *Intensive treatment strategies may not provide superior outcomes in mantle cell lymphoma: overall survival exceeding 7 years with standard therapies.* Ann Oncol, 2008. **19**(7): p. 1327-30.
8. Iqbal, J., et al., *Genomic signatures in B-cell lymphoma: How can these improve precision in diagnosis and inform prognosis?* Blood Rev, 2016. **30**(2): p. 73-88.
9. Rosenwald, A., et al., *The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma.* Cancer Cell, 2003. **3**(2): p. 185-197.
10. Dreyling, M., *Mantle cell lymphoma: biology, clinical presentation, and therapeutic approaches.* Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2014: p. 191-8.
11. Aukema, S.M., et al., *Double-hit B-cell lymphomas.* Blood, 2011. **117**(8): p. 2319-31.
12. Williams, M.E., C.D. Westermann, and S.H. Swerdlow, *Genotypic characterization of centrocytic lymphoma: frequent rearrangement of the chromosome 11 bcl-1 locus.* Blood, 1990. **76**(7): p. 1387-91.
13. Motokura, T., et al., *A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene.* Nature, 1991. **350**(6318): p. 512-5.
14. 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.
15. Swerdlow, S.H., et al., *The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms.* Blood, 2016. **127**(20): p. 2375-2390.
16. Jares, P., D. Colomer, and E. Campo, *Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma.* J Clin Invest, 2012. **122**(10): p. 3416-23.
17. Weisenburger, D.D., H. Kim, and H. Rappaport, *Mantle-zone lymphoma: a follicular variant of intermediate lymphocytic lymphoma.* Cancer, 1982. **49**(7): p. 1429-38.
18. Klapper, W., *Histopathology of mantle cell lymphoma.* Semin Hematol, 2011. **48**(3): p. 148-54.
19. Tiemann, M., et al., *Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network.* Br J Haematol, 2005. **131**(1): p. 29-38.
20. 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.
21. Leich, E., et al., *Diagnostic and prognostic significance of gene expression profiling in lymphomas.* Apmis, 2007. **115**(10): p. 1135-46.
22. Hernandez, L., et al., *CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus.* Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2199-206.
23. Hutter, G., et al., *Differential effect of epigenetic alterations and genomic deletions of CDK inhibitors [p16(INK4a), p15(INK4b), p14(ARF)] in mantle cell lymphoma.* Genes Chromosomes Cancer, 2006. **45**(2): p. 203-10.

24. Leshchenko, V.V., et al., *Genomewide DNA methylation analysis reveals novel targets for drug development in mantle cell lymphoma*. *Blood*, 2010. **116**(7): p. 1025-1034.
25. Caimi, P.F., et al., *Clinical approach to diffuse large B cell lymphoma*. *Blood Rev*, 2016. **30**(6): p. 477-491.
26. Morton, L.M., et al., *Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001*. *Blood*, 2006. **107**(1): p. 265-76.
27. Scholz, C. and J. Eucker, *13 - Aggressive (hoch maligne) Non-Hodgkin-Lymphome*, in *Facharzt Hämatologie Onkologie (3. Auflage)*, K. Possinger and A.C. Regierer, Editors. 2015, Urban & Fischer: Munich. p. 461-485.
28. Schmidt, C., et al., *Diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom*, in *Maligne Lymphome*, M. Dreyling, Editor. 2015, Tumorzentrum München: München. p. 143-158.
29. Stansfeld, A.G., et al., *Updated Kiel classification for lymphomas*. *Lancet*, 1988. **1**(8580): p. 292-3.
30. Swerdlow, S.H., et al., *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition*. 4 ed. Vol. 2. 2008, Lyon: IARC Press.
31. Camara, D.A., et al., *Immunoblastic morphology in diffuse large B-cell lymphoma is associated with a nongerminal center immunophenotypic profile*. *Leuk Lymphoma*, 2007. **48**(5): p. 892-6.
32. Sweetenham, J.W., et al., *Therapy of diffuse large B-cell lymphoma*, in *Lymphoma: Pathology, Diagnosis, and Treatment*, J.W. Sweetenham, M.E. Williams, and R. Marcus, Editors. 2013, Cambridge University Press: Cambridge. p. 191-207.
33. Haralambieva, E., et al., *Anaplastic large-cell lymphomas of B-cell phenotype are anaplastic lymphoma kinase (ALK) negative and belong to the spectrum of diffuse large B-cell lymphomas*. *Br J Haematol*, 2000. **109**(3): p. 584-91.
34. Hans, C.P., et al., *Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray*. *Blood*, 2004. **103**(1): p. 275-82.
35. Alizadeh, A.A., et al., *Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling*. *Nature*, 2000. **403**(6769): p. 503-11.
36. Rosenwald, A., et al., *The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(25): p. 1937-47.
37. Turturro, F., *Constitutive NF- κ B activation underlines major mechanism of drug resistance in relapsed refractory diffuse large B cell lymphoma*. *BioMed research international*, 2015. **2015**.
38. Wittkop, T., et al., *Comprehensive cluster analysis with Transitivity Clustering*. *Nat Protoc*, 2011. **6**(3): p. 285-95.
39. Scott, D.W., et al., *Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue*. *Blood*, 2014. **123**(8): p. 1214-7.
40. Colomo, L., et al., *Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma*. *Blood*, 2003. **101**(1): p. 78-84.
41. Read, J.A., et al., *Evaluating cell-of-origin subtype methods for predicting diffuse large B-cell lymphoma survival: a meta-analysis of gene expression profiling and immunohistochemistry algorithms*. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2014. **14**(6): p. 460-467.e2.
42. Roulland, S., et al., *t(14;18) Translocation: A predictive blood biomarker for follicular lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(13): p. 1347-55.
43. Tamura, M., et al., *Germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma of the duodenum is associated with t(14;18) translocation*. *Pathol Int*, 2011. **61**(12): p. 742-8.
44. Huang, J.Z., et al., *The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile*. *Blood*, 2002. **99**(7): p. 2285-90.
45. Iqbal, J., et al., *Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma*. *Leukemia*, 2007. **21**(11): p. 2332-43.
46. Muramatsu, M., et al., *Rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms: comparison with lymphomas associated with BCL2 rearrangement*. *Br J Haematol*, 1996. **93**(4): p. 911-20.

47. Ichinohasama, R., et al., *A recurrent nonrandom translocation (3;7)(q27;p12) associated with BCL-6 gene rearrangement in B-cell diffuse large cell lymphoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1998. **104**(1): p. 19-27.
48. Barrans, S., et al., *Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(20): p. 3360-5.
49. Savage, K.J., et al., *MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy*. *Blood*, 2009. **114**(17): p. 3533-7.
50. Young, K.H., et al., *Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study*. *Blood*, 2008. **112**(8): p. 3088-3098.
51. Moore, E.M., et al., *Further Exploration of the Complexities of Large B-Cell Lymphomas With MYC Abnormalities and the Importance of a Blastoid Morphology*. *Am J Surg Pathol*, 2017.
52. Swerdlow, S.H., *Diagnosis of 'double hit' diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2014. **2014**(1): p. 90-9.
53. Hu, S., et al., *MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program*. *Blood*, 2013. **121**(20): p. 4021-31; quiz 4250.
54. Carbone, P.P., et al., *Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification*. *Cancer Res*, 1971. **31**(11): p. 1860-1.
55. Hoster, E., et al., *A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma*. *Blood*, 2008. **111**(2): p. 558-65.
56. Hoster, E., et al., *Confirmation of the mantle-cell lymphoma International Prognostic Index in randomized trials of the European Mantle-Cell Lymphoma Network*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(13): p. 1338-46.
57. Scholz, C. and J. Eucker, *12.3 - Mantelzelllymphom*, in *Facharzt Hämatologie Onkologie (3. Auflage)*, K. Possinger and A.C. Regierer, Editors. 2015, Urban & Fischer: Munich. p. 429-433.
58. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, *Effect of age on the characteristics and clinical behavior of non-Hodgkin's lymphoma patients*. *Annals of Oncology*, 1997. **8**(10): p. 973-978.
59. Martelli, M., et al., *Diffuse large B-cell lymphoma*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2013. **87**(2): p. 146-71.
60. National Comprehensive Cancer Network, *B-Cell Lymphomas*, in *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines)*. 2017, National Comprehensive Cancer Network, Inc.: Fort Washington, PA, USA.
61. Delarue, R., et al., *CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte*. *Blood*, 2013. **121**(1): p. 48-53.
62. 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*. *Lancet*, 2016. **388**(10044): p. 565-75.
63. 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.
64. Kluin-Nelemans, H.C., et al., *Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma*. *N Engl J Med*, 2012. **367**(6): p. 520-31.
65. Le Gouill, S., et al., *Rituximab Maintenance after Autologous Stem Cell Transplantation Prolongs Survival in Younger Patients with Mantle Cell Lymphoma: Final Results of the Randomized Phase 3 LyMa Trial of the Lysa/Goelams Group*. *Blood*, 2016. **128**(22): p. 145-145.

66. Martin, P., et al., *Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(8): p. 1209-13.
67. Cohen, J.B., et al., *Deferred therapy is associated with improved overall survival in patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma*. Cancer, 2016. **122**(15): p. 2356-63.
68. McKelvey, E.M., et al., *Hydroxyldaunomycin (Adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma*. Cancer, 1976. **38**(4): p. 1484-93.
69. Coiffier, B., et al., *CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma*. N Engl J Med, 2002. **346**(4): p. 235-42.
70. Vitolo, U., et al., *Obinutuzumab or Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma*. J Clin Oncol, 2017: p. Jco2017733402.
71. Wilson, W.H., et al., *Phase III Randomized Study of R-CHOP Versus DA-EPOCH-R and Molecular Analysis of Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma: CALGB/Alliance 50303*. Blood, 2016. **128**(22): p. 469-469.
72. Pfreundschuh, M., et al., *CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group*. Lancet Oncol, 2011. **12**(11): p. 1013-22.
73. Leitch, H.A., et al., *Limited-stage mantle-cell lymphoma*. Ann Oncol, 2003. **14**(10): p. 1555-61.
74. Campo, E. and S. Rule, *Mantle cell lymphoma: evolving management strategies*. Blood, 2015. **125**(1): p. 48-55.
75. 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.
76. Ruan, J., et al., *Bortezomib plus CHOP-rituximab for previously untreated diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma*. J Clin Oncol, 2011. **29**(6): p. 690-7.
77. Robak, T., et al., *Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma*. N Engl J Med, 2015. **372**(10): p. 944-53.
78. Ruan, J., et al., *Lenalidomide plus Rituximab as Initial Treatment for Mantle-Cell Lymphoma*. N Engl J Med, 2015. **373**(19): p. 1835-44.
79. Andorsky, D.J., et al., *MAGNIFY: Phase IIIb Randomized Study of Lenalidomide Plus Rituximab (R²) Followed By Lenalidomide Vs. Rituximab Maintenance in Subjects with Relapsed/Refractory Follicular, Marginal Zone, or Mantle Cell Lymphoma*. Blood, 2016. **128**(22): p. 1798-1798.
80. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, *A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma*. N Engl J Med, 1993. **329**(14): p. 987-94.
81. Sehn, L.H., et al., *The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP*. Blood, 2007. **109**(5): p. 1857-61.
82. Eskelund, C.W., et al., *15-year follow-up of the Second Nordic Mantle Cell Lymphoma trial (MCL2): prolonged remissions without survival plateau*. Br J Haematol, 2016. **175**(3): p. 410-418.
83. Tsujimoto, Y., et al., *Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation*. Science, 1984. **224**(4656): p. 1403-6.
84. Inaba, T., et al., *Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes*. Genomics, 1992. **13**(3): p. 565-74.
85. Sherr, C.J., D. Beach, and G.I. Shapiro, *Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy*. Cancer Discov, 2016. **6**(4): p. 353-67.
86. Hamilton, E. and J.R. Infante, *Targeting CDK4/6 in patients with cancer*. Cancer Treat Rev, 2016. **45**: p. 129-38.
87. Nurse, P., *A long twentieth century of the cell cycle and beyond*. Cell, 2000. **100**(1): p. 71-8.

88. Qie, S. and J.A. Diehl, *Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment*. J Mol Med (Berl), 2016. **94**(12): p. 1313-1326.
89. Ewen, M.E., et al., *Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins*. Cell, 1993. **73**(3): p. 487-97.
90. Ewen, M.E., et al., *TGF beta inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest*. Cell, 1993. **74**(6): p. 1009-20.
91. Kato, J., et al., *Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4*. Genes Dev, 1993. **7**(3): p. 331-42.
92. Kato, J.Y., et al., *Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase*. Molecular and Cellular Biology, 1994. **14**(4): p. 2713-2721.
93. Sherr, C.J., *G1 phase progression: cycling on cue*. Cell, 1994. **79**(4): p. 551-5.
94. Shapiro, G.I., *Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment*. J Clin Oncol, 2006. **24**(11): p. 1770-83.
95. Dowdy, S.F., et al., *Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins*. Cell, 1993. **73**(3): p. 499-511.
96. Weinberg, R.A., *Tumor suppressor genes*. Science, 1991. **254**(5035): p. 1138-46.
97. Harbour, J.W., et al., *Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1*. Cell, 1999. **98**(6): p. 859-69.
98. DeGregori, J., T. Kowalik, and J.R. Nevins, *Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(8): p. 4215-24.
99. Kel, A.E., et al., *Computer-assisted identification of cell cycle-related genes: new targets for E2F transcription factors*¹¹Edited by J. Karn. Journal of Molecular Biology, 2001. **309**(1): p. 99-120.
100. Chen, H.-Z., S.-Y. Tsai, and G. Leone, *Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(11): p. 785-797.
101. Santarius, T., et al., *A census of amplified and overexpressed human cancer genes*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(1): p. 59-64.
102. Fry, D.W., et al., *Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts*. Mol Cancer Ther, 2004. **3**(11): p. 1427-38.
103. VanArsdale, T., et al., *Molecular Pathways: Targeting the Cyclin D-CDK4/6 Axis for Cancer Treatment*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(13): p. 2905-10.
104. Polk, A., et al., *Specific CDK4/6 inhibition in breast cancer: a systematic review of current clinical evidence*. ESMO Open, 2016. **1**(6): p. e000093.
105. Srinivasan, L., et al., *PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival*. Cell, 2009. **139**(3): p. 573-86.
106. Dal Porto, J.M., et al., *B cell antigen receptor signaling 101*. Mol Immunol, 2004. **41**(6-7): p. 599-613.
107. 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.
108. Kitamura, D., et al., *A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene*. Nature, 1991. **350**(6317): p. 423-6.
109. Tsukada, S., et al., *Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia*. Cell, 1993. **72**(2): p. 279-90.
110. Kurosaki, T., H. Shinohara, and Y. Baba, *B cell signaling and fate decision*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 21-55.
111. Tolar, P., H.W. Sohn, and S.K. Pierce, *The initiation of antigen-induced B cell antigen receptor signaling viewed in living cells by fluorescence resonance energy transfer*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1168-76.
112. Sohn, H.W., et al., *Fluorescence resonance energy transfer in living cells reveals dynamic membrane changes in the initiation of B cell signaling*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(21): p. 8143-8148.

113. Mkaddem, S.B., et al., *Lyn and Fyn function as molecular switches that control immunoreceptors to direct homeostasis or inflammation*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 246.
114. Bolland, S. and J.V. Ravetch, *Inhibitory pathways triggered by ITIM-containing receptors*. Adv Immunol, 1999. **72**: p. 149-77.
115. Seda, V. and M. Mraz, *B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells*. Eur J Haematol, 2015. **94**(3): p. 193-205.
116. Salmena, L., A. Carracedo, and P.P. Pandolfi, *Tenets of PTEN tumor suppression*. Cell, 2008. **133**(3): p. 403-14.
117. Brauweiler, A., et al., *Differential Regulation of B Cell Development, Activation, and Death by the Src Homology 2 Domain-Containing 5' Inositol Phosphatase (Ship)*. The Journal of Experimental Medicine, 2000. **191**(9): p. 1545-1554.
118. Rowley, R.B., et al., *Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation*. J Biol Chem, 1995. **270**(19): p. 11590-4.
119. Baba, Y., et al., *BLNK mediates Syk-dependent Btk activation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(5): p. 2582-2586.
120. Wang, Y., et al., *The physiologic role of CD19 cytoplasmic tyrosines*. Immunity, 2002. **17**(4): p. 501-14.
121. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fc[gamma] receptors as regulators of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 34-47.
122. Saito, K., A.M. Scharenberg, and J.P. Kinet, *Interaction between the Btk PH domain and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate directly regulates Btk*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16201-6.
123. Takata, M., et al., *Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways*. The EMBO Journal, 1994. **13**(6): p. 1341-1349.
124. Chiu, C.W., et al., *BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins*. Embo j, 2002. **21**(23): p. 6461-72.
125. Takata, M. and T. Kurosaki, *A role for Bruton's tyrosine kinase in B cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C-gamma 2*. J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 31-40.
126. Hashimoto, S., et al., *Identification of the SH2 domain binding protein of Bruton's tyrosine kinase as BLNK--functional significance of Btk-SH2 domain in B-cell antigen receptor-coupled calcium signaling*. Blood, 1999. **94**(7): p. 2357-64.
127. Sugawara, H., et al., *Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor*. The EMBO Journal, 1997. **16**(11): p. 3078-3088.
128. Dolmetsch, R.E., et al., *Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration*. Nature, 1997. **386**(6627): p. 855-8.
129. Hashimoto, A., et al., *Involvement of guanosine triphosphatases and phospholipase C-gamma2 in extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase activation by the B cell antigen receptor*. J Exp Med, 1998. **188**(7): p. 1287-95.
130. Dong, C., R.J. Davis, and R.A. Flavell, *MAP kinases in the immune response*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 55-72.
131. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1911-2.
132. Kyriakis, J.M., et al., *The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases*. Nature, 1994. **369**(6476): p. 156-60.
133. Wisdom, R., R.S. Johnson, and C. Moore, *c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms*. The EMBO Journal, 1999. **18**(1): p. 188-197.
134. Mugami, S., et al., *Differential roles of PKC isoforms (PKCs) in GnRH stimulation of MAPK phosphorylation in gonadotrope derived cells*. Mol Cell Endocrinol, 2017.
135. Kawakami, T., Y. Kawakami, and J. Kitaura, *Protein kinase C beta (PKC beta): normal functions and diseases*. J Biochem, 2002. **132**(5): p. 677-82.

136. Krappmann, D., et al., *B-cell receptor- and phorbol ester-induced NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase activation in B cells requires novel protein kinase C's*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(19): p. 6640-50.
137. Dobkin-Bekman, M., et al., *Differential Role of PKC Isoforms in GnRH and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and Jun N-Terminal Kinase*. Endocrinology, 2010. **151**(10): p. 4894-4907.
138. Schönwasser, D.C., et al., *Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(2): p. 790-8.
139. Hers, I., E.E. Vincent, and J.M. Tavaré, *Akt signalling in health and disease*. Cell Signal, 2011. **23**(10): p. 1515-27.
140. Manning, B.D. and A. Toker, *AKT/PKB Signaling: Navigating the Network*. Cell, 2017. **169**(3): p. 381-405.
141. Cho, H., et al., *Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(42): p. 38349-38352.
142. Alessi, D.R., et al., *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1*. Embo j, 1996. **15**(23): p. 6541-51.
143. Vanhaesebroeck, B., et al., *The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(5): p. 329-41.
144. Thomas, C.C., et al., *High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*. Curr Biol, 2002. **12**(14): p. 1256-62.
145. Milburn, C.C., et al., *Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 3): p. 531-8.
146. Calleja, V., et al., *Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo*. PLoS biology, 2007. **5**(4): p. e95.
147. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-1101.
148. Leslie, N.R., et al., *Understanding PTEN regulation: PIP2, polarity and protein stability*. Oncogene, 2008. **27**(41): p. 5464-76.
149. Alessi, D.R., et al., *Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase*. FEBS Letters, 1996. **399**(3): p. 333-338.
150. Cross, D.A.E., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-789.
151. Diehl, J.A., et al., *Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization*. Genes Dev, 1998. **12**(22): p. 3499-511.
152. Welcker, M., et al., *Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation*. Molecular cell, 2003. **12**(2): p. 381-392.
153. Rimerman, R.A., A. Gellert-Randleman, and J.A. Diehl, *Wnt1 and MEK1 cooperate to promote cyclin D1 accumulation and cellular transformation*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14736-42.
154. van der Vos, K.E. and P.J. Coffey, *The extending network of FOXO transcriptional target genes*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(4): p. 579-92.
155. Saxton, R.A. and D.M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. Cell, 2017. **169**(2): p. 361-371.
156. Sancak, Y., et al., *PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase*. Molecular Cell, 2007. **25**(6): p. 903-915.
157. Menon, S., et al., *Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of mTORC1 at the Lysosome*. Cell, 2014. **156**(4): p. 771-785.
158. Gelbert, L.M., et al., *Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine*. Invest New Drugs, 2014. **32**(5): p. 825-37.

159. Seiler, T. and M. Dreyling, *Bruton's tyrosine kinase inhibitors in B-cell lymphoma: current experience and future perspectives*. Expert Opin Investig Drugs, 2017. **26**(8): p. 909-915.
160. European Medicines Agency. *Imbruvica*. 2017 [cited 2017 10. Sept.]; Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003791/human_med_001801.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
161. 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.
162. European Medicines Agency. *Zydelig*. 2017 [cited 2017 10. Sept.]; Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003843/human_med_001803.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
163. Liu, N., et al., *BAY 80-6946 Is a Highly Selective Intravenous PI3K Inhibitor with Potent p110 α and p110 δ Activities in Tumor Cell Lines and Xenograft Models*. Molecular Cancer Therapeutics, 2013. **12**(11): p. 2319-2330.
164. Blanco Aparicio, C., et al., *Abstract A275: Co-targeting PIM and PI3K/mTOR pathways with a single molecule: Novel orally available combined PIM/PI3K and PIM/PI3K/mTOR kinase inhibitors*. Molecular Cancer Therapeutics, 2013. **12**(11 Supplement): p. A275-A275.
165. Smith, M.C., et al., *Characterization of LY3023414, a Novel PI3K/mTOR Dual Inhibitor Eliciting Transient Target Modulation to Impede Tumor Growth*. Mol Cancer Ther, 2016. **15**(10): p. 2344-2356.
166. Souers, A.J., et al., *ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets*. Nat Med, 2013. **19**(2): p. 202-208.
167. European Medicines Agency. *Venclyxto*. 2017 [cited 2017 10. Sept.]; Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/004106/human_med_002045.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
168. Patnaik, A., et al., *LY2835219, a novel cell cycle inhibitor selective for CDK4/6, in combination with fulvestrant for patients with hormone receptor positive (HR+) metastatic breast cancer*. 2014, American Society of Clinical Oncology.
169. Dickler, M.N., et al., *MONARCH 1, A Phase II Study of Abemaciclib, a CDK4 and CDK6 Inhibitor, as a Single Agent, in Patients with Refractory HR(+)/HER2(-) Metastatic Breast Cancer*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(17): p. 5218-5224.
170. Sledge, G.W., Jr., et al., *MONARCH 2: Abemaciclib in Combination With Fulvestrant in Women With HR+/HER2- Advanced Breast Cancer Who Had Progressed While Receiving Endocrine Therapy*. J Clin Oncol, 2017. **35**(25): p. 2875-2884.
171. Goetz, M.P., et al., *MONARCH 3: Abemaciclib As Initial Therapy for Advanced Breast Cancer*. J Clin Oncol, 2017. **35**(32): p. 3638-3646.
172. 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*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(29): p. 13075-13080.
173. Pan, Z., et al., *Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase*. ChemMedChem, 2007. **2**(1): p. 58-61.
174. Chanan-Khan, A., et al., *Ibrutinib combined with bendamustine and rituximab compared with placebo, bendamustine, and rituximab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma (HELIOS): a randomised, double-blind, phase 3 study*. Lancet Oncol, 2016. **17**(2): p. 200-211.
175. Burger, J.A., et al., *Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia*. N Engl J Med, 2015. **373**(25): p. 2425-37.
176. Furtado, M., et al., *Ibrutinib-associated lymphocytosis corresponds to bone marrow involvement in mantle cell lymphoma*. Br J Haematol, 2015. **170**(1): p. 131-4.
177. Stilgenbauer, S., et al., *Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study*. Lancet Oncol, 2016. **17**(6): p. 768-778.

178. Hutter, G., et al., *Use of polymorphisms in the noncoding region of the human mitochondrial genome to identify potential contamination of human leukemia-lymphoma cell lines*. The Hematology Journal, 2004. **5**(1): p. 61-68.
179. Ehrlich, P. and K. Shiga, *Farbentherapeutische versuche bei trypanosomenerkrankung*. Berliner klinische Wochenschrift, 1904. **41**: p. 329-332.
180. Ehrlich, P., *Chemotherapeutische Trypanosomen-Studien*. Berliner klinische Wochenschrift, 1907. **44**: p. 233-236, 280-283, 310-314, 341-344.
181. Strober, W., *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3B.
182. Killemann, U. and E. Schneider, *Vergleich verschiedenster Methoden zur Bestimmung von Zellzahlen und Zellvitalitäten bei der Optimierung der Formulierung von Kulturmedien mit Hybridoma-Zellen*. BIOSpektrum, 2004. **1**(10): p. 112-114.
183. Macherey-Nagel GmbH & Co KG, *Genomic DNA from Blood. User manual NucleoSpin® Blood*. 2014: Düren, Deutschland.
184. Krishan, A., *Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining*. J Cell Biol, 1975. **66**(1): p. 188-93.
185. LePecq, J.B. and C. Paoletti, *A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization*. J Mol Biol, 1967. **27**(1): p. 87-106.
186. Darzynkiewicz, Z. and X. Huang, *Analysis of cellular DNA content by flow cytometry*. Curr Protoc Immunol, 2004. **Chapter 5**: p. Unit 5.7.
187. Watson, J.V., S.H. Chambers, and P.J. Smith, *A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak*. Cytometry, 1987. **8**(1): p. 1-8.
188. Tree Star Inc., *FlowJo Data Analysis Software for Flow Cytometry- Version X User Documentation Cell Cycle Tutorial*. 2014, Tree Star Inc. 1997-2014.
189. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. The Journal of Immunology, 1992. **148**(7): p. 2207-2216.
190. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V*. Journal of immunological methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.
191. Zembruski, N.C., et al., *7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry*. Anal Biochem, 2012. **429**(1): p. 79-81.
192. Schmid, I., et al., *Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry*. Cytometry, 1992. **13**(2): p. 204-208.
193. Gill, J., et al., *7-Amino-actinomycin D as a cytochemical probe. I. Spectral properties*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1975. **23**(11): p. 793-799.
194. Lecoecur, H., et al., *Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods*. Journal of immunological methods, 1997. **209**(2): p. 111-123.
195. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
196. Berridge, M.V., et al., *The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts*. Biochemica, 1996. **4**(1): p. 14-19.
197. Ishiyama, M., et al., *A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan*. Chem. Pharm. Bull, 1993. **41**: p. 1118-1122.
198. Ishiyama, M., et al., *A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet*. Biol Pharm Bull, 1996. **19**(11): p. 1518-20.
199. Hayon, T., et al., *Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia*. Leuk Lymphoma, 2003. **44**(11): p. 1957-62.
200. Roche Applied Science, *Cell Proliferation Reagent WST-1*. 2006: 68298 Mannheim, Germany.

201. Crouch, S.P., et al., *The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity*. J Immunol Methods, 1993. **160**(1): p. 81-88.
202. Promega Corporation, *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*. 2015: 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399 USA.
203. Cree, I.A., et al., *Methotrexate chemosensitivity by ATP luminescence in human leukemia cell lines and in breast cancer primary cultures: comparison of the TCA-100 assay with a clonogenic assay*. Anticancer Drugs, 1995. **6**(3): p. 398-404.
204. BIOCHROM GmbH, *Separating solutions and lectins: Biocoll*, BIOCHROM, Editor. 2015: Berlin. p. 72-73.
205. Webb, J.L., *Enzyme and metabolic inhibitors Vol. 1*, in *Enzyme and metabolic inhibitors*. 1963, Acad. Press: New York. p. 55-79; 488-512.
206. Cheung, Y.K. and J.H. Klotz, *The Mann Whitney Wilcoxon distribution using linked lists*. Statistica Sinica, 1997: p. 805-813.
207. Kruskal, W.H. and W.A. Wallis, *Use of ranks in one-criterion variance analysis*. Journal of the American statistical Association, 1952. **47**(260): p. 583-621.
208. Dunn, O.J., *Multiple comparisons using rank sums*. Technometrics, 1964. **6**(3): p. 241-252.
209. Rimokh, R., et al., *Rearrangement and overexpression of the BCL-1/PRAD-1 gene in intermediate lymphocytic lymphomas and in t(11q13)-bearing leukemias*. Blood, 1993. **81**(11): p. 3063-7.
210. Witkiewicz, A.K., et al., *The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments*. Cell Cycle, 2011. **10**(15): p. 2497-503.
211. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(3): p. 153-66.
212. Rauert-Wunderlich, H., et al., *Targeting protein kinase C in mantle cell lymphoma*. Br J Haematol, 2016. **173**(3): p. 394-403.
213. Chou, T.C., *Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method*. Cancer Res, 2010. **70**(2): p. 440-6.
214. Chiron, D., et al., *Cell-cycle reprogramming for PI3K inhibition overrides a relapse-specific C481S BTK mutation revealed by longitudinal functional genomics in mantle cell lymphoma*. Cancer Discov, 2014. **4**(9): p. 1022-35.
215. Yang, C., et al., *CDK4/6 Inhibitor PD 0332991 Sensitizes Acute Myeloid Leukemia to Cytarabine-Mediated Cytotoxicity*. Cancer Res, 2015.
216. Chu, M.Y. and G.A. Fischer, *A proposed mechanism of action of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine as an inhibitor of the growth of leukemic cells*. Biochem Pharmacol, 1962. **11**: p. 423-30.
217. Emadi, A. and J.E. Karp, *The clinically relevant pharmacogenomic changes in acute myelogenous leukemia*. Pharmacogenomics, 2012. **13**(11): p. 1257-69.
218. Peters, G.J., *Novel developments in the use of antimetabolites*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2014. **33**(4-6): p. 358-74.
219. Ingham, M. and G.K. Schwartz, *Cell-Cycle Therapeutics Come of Age*. J Clin Oncol, 2017: p. Jco2016690032.
220. López-Sáez, J., G. Gimenez-Martin, and A. González-Fernández, *Duration of the cell division cycle and its dependence on temperature*. Cell and Tissue Research, 1966. **75**(3): p. 591-600.
221. Amin, H.M., et al., *Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines*. Arch Pathol Lab Med, 2003. **127**(4): p. 424-31.
222. Jeon, H.J., et al., *Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line*. Br J Haematol, 1998. **102**(5): p. 1323-6.
223. Dean, J.L., et al., *Therapeutic CDK4/6 inhibition in breast cancer: key mechanisms of response and failure*. Oncogene, 2010. **29**(28): p. 4018-32.

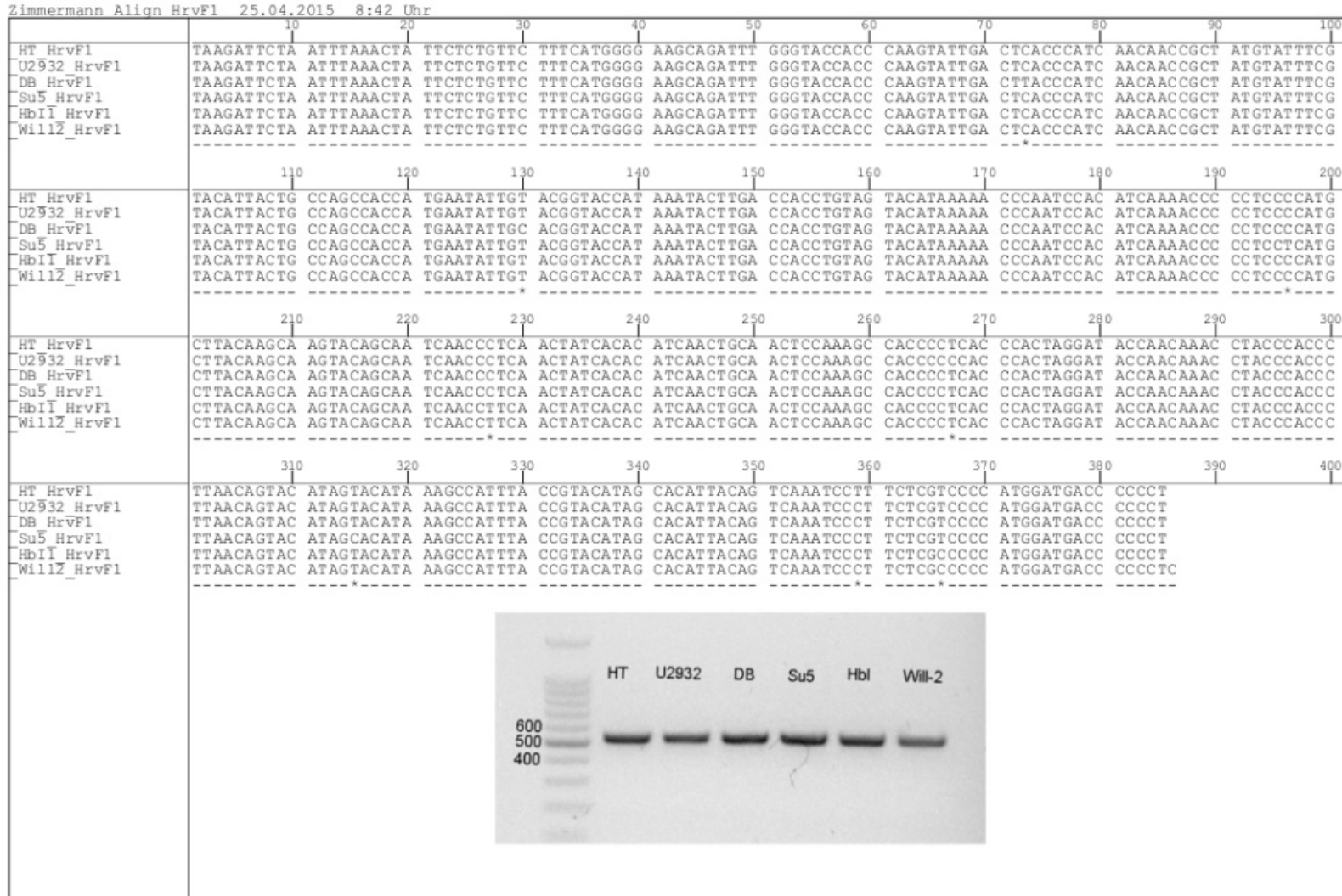
224. Marzec, M., et al., *Mantle cell lymphoma cells express predominantly cyclin D1a isoform and are highly sensitive to selective inhibition of CDK4 kinase activity*. *Blood*, 2006. **108**(5): p. 1744-50.
225. Leonard, J.P., et al., *Selective CDK4/6 inhibition with tumor responses by PD0332991 in patients with mantle cell lymphoma*. *Blood*, 2012. **119**(20): p. 4597-607.
226. Shan, B., et al., *The transcription factor E2F-1 mediates the autoregulation of RB gene expression*. *Molecular and cellular biology*, 1994. **14**(1): p. 299-309.
227. Zacksenhaus, E., et al., *Molecular cloning and characterization of the mouse RB1 promoter*. *Oncogene*, 1993. **8**(9): p. 2343-2351.
228. Agromayor, M., et al., *Visualizing dynamic E2F-mediated repression in vivo*. *Molecular and cellular biology*, 2006. **26**(12): p. 4448-4461.
229. Burkhart, D.L., et al., *Regulation of RB transcription in vivo by RB family members*. *Molecular and cellular biology*, 2010. **30**(7): p. 1729-1745.
230. O'Leary, B., R.S. Finn, and N.C. Turner, *Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016. **13**(7): p. 417-30.
231. Chiron, D., et al., *Induction of prolonged early G1 arrest by CDK4/CDK6 inhibition reprograms lymphoma cells for durable PI3Kdelta inhibition through PIK3IP1*. *Cell Cycle*, 2013. **12**(12): p. 1892-900.
232. He, X., et al., *PIK3IP1, a negative regulator of PI3K, suppresses the development of hepatocellular carcinoma*. *Cancer research*, 2008. **68**(14): p. 5591-5598.
233. Julien, L.A., et al., *mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling*. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(4): p. 908-21.
234. Zhang, J., et al., *Inhibition of Rb Phosphorylation Leads to mTORC2-Mediated Activation of Akt*. *Mol Cell*, 2016. **62**(6): p. 929-42.
235. Hsieh, F.S., et al., *Palbociclib induces activation of AMPK and inhibits hepatocellular carcinoma in a CDK4/6-independent manner*. *Molecular Oncology*, 2017.
236. Anders, L., et al., *A Systematic Screen for CDK4/6 Substrates Links FOXM1 Phosphorylation to Senescence Suppression in Cancer Cells*. *Cancer Cell*, 2011. **20**(5): p. 620-634.
237. Uras, I.Z., et al., *Palbociclib treatment of FLT3-ITD+ AML cells uncovers a kinase-dependent transcriptional regulation of FLT3 and PIM1 by CDK6*. *Blood*, 2016. **127**(23): p. 2890-2902.
238. Dillon, L.M., et al., *P-REX1 creates a positive feedback loop to activate growth factor receptor, PI3K/AKT and MEK/ERK signaling in breast cancer*. *Oncogene*, 2015. **34**(30): p. 3968-3976.
239. Olanich, M.E., et al., *CDK4 Amplification Reduces Sensitivity to CDK4/6 Inhibition in Fusion-Positive Rhabdomyosarcoma*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(21): p. 4947-59.
240. Cen, L., et al., *p16-Cdk4-Rb axis controls sensitivity to a cyclin-dependent kinase inhibitor PD0332991 in glioblastoma xenograft cells*. *Neuro Oncol*, 2012. **14**(7): p. 870-81.
241. Tula-Sanchez, A.A., et al., *A model of sensitivity and resistance to histone deacetylase inhibitors in diffuse large B cell lymphoma: Role of cyclin-dependent kinase inhibitors*. *Cancer Biology & Therapy*, 2013. **14**(10): p. 949-961.
242. Herrera-Abreu, M.T., et al., *Early adaptation and acquired resistance to CDK4/6 inhibition in estrogen receptor-positive breast cancer*. *Cancer research*, 2016. **76**(8): p. 2301-2313.
243. Guri, Y. and M.N. Hall, *mTOR Signaling Confers Resistance to Targeted Cancer Drugs*. *Trends in Cancer*, 2016. **2**(11): p. 688-697.
244. Keane, N.A., et al., *Targeting the Pim kinases in multiple myeloma*. *Blood Cancer Journal*, 2015. **5**(7): p. e325.
245. Nair, J.R., et al., *Novel inhibition of PIM2 kinase has significant anti-tumor efficacy in multiple myeloma*. *Leukemia*, 2017. **31**(8): p. 1715-1726.
246. Fan, R.F., et al., *PIM-1 kinase inhibitor SMI-4a exerts antitumor effects in chronic myeloid leukemia cells by enhancing the activity of glycogen synthase kinase 3beta*. *Mol Med Rep*, 2017.
247. Kaufmann, S.H., et al., *Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis*. *Cancer Res*, 1993. **53**(17): p. 3976-85.

248. Padi, S.K.R., et al., *Targeting the PIM protein kinases for the treatment of a T-cell acute lymphoblastic leukemia subset*. *Oncotarget*, 2017. **8**(18): p. 30199-30216.
249. Freysoldt, B., et al., *Cotargeting of PIM, PI3K and Mtor in Mantle Cell Lymphoma (MCL)*. *Blood*, 2015. **126**(23): p. 5120-5120.
250. Gu, J.J., et al., *Palbociclib (PD-0332991), a Potent Selective CDK4/6 Inhibitor, Overcomes Therapy-Resistant and Sensitizes Diffuse Large B-Cell Lymphoma Pre-Clinical Models to Chemo-Reagents*. *Blood*, 2015. **126**(23): p. 3997.
251. Zlamalikova, L., et al., *Expression of D-type cyclins in mantle cell and diffuse large B-cell lymphomas*. *Oncol Rep*, 2016. **35**(5): p. 2673-80.
252. Vela-Chavez, T., et al., *Cyclin D1 positive diffuse large B-cell lymphoma is a post-germinal center-type lymphoma without alterations in the CCND1 gene locus*. *Leuk Lymphoma*, 2011. **52**(3): p. 458-66.
253. Delabie, J. and M. Brodtkorb-Eide, *Diffuse large B-cell lymphoma cycling off the main track*. *Leukemia & Lymphoma*, 2011. **52**(3): p. 358-359.
254. Metcalf, R.A., et al., *Characterization of D-Cyclin Proteins in Hematolymphoid Neoplasms: Lack of Specificity of Cyclins D2 and D3 Expression in Lymphoma Subtypes*. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 2010. **23**(3): p. 420-433.
255. Bea, S., et al., *Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction*. *Blood*, 2005. **106**(9): p. 3183-90.
256. Monti, S., et al., *Integrative Analysis Reveals an Outcome-Associated and Targetable Pattern of p53 and Cell Cycle Deregulation in Diffuse Large B Cell Lymphoma*. *Cancer Cell*, 2012. **22**(3): p. 359-372.
257. Bai, M., et al., *Low expression of p27 protein combined with altered p53 and Rb/p16 expression status is associated with increased expression of cyclin A and cyclin B1 in diffuse large B-cell lymphomas*. *Mod Pathol*, 2001. **14**(11): p. 1105-13.
258. Zhang, Y.X., et al., *Antiproliferative effects of CDK4/6 inhibition in CDK4-amplified human liposarcoma in vitro and in vivo*. *Mol Cancer Ther*, 2014. **13**(9): p. 2184-93.
259. Rader, J., et al., *Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(22): p. 6173-82.
260. Malumbres, M., et al., *Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6*. *Cell*, 2004. **118**(4): p. 493-504.
261. Asghar, U., et al., *The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy*. *Nature reviews. Drug discovery*, 2015. **14**(2): p. 130-146.
262. Muranen, T., F. Meric-Bernstam, and G.B. Mills, *Promising rationally derived combination therapy with PI3K and CDK4/6 inhibitors*. *Cancer Cell*, 2014. **26**(1): p. 7-9.
263. Devita, V.T., R.C. Young, and G.P. Canellos, *Combination versus single agent chemotherapy: a review of the basis for selection of drug treatment of cancer*. *Cancer*, 1975. **35**(1): p. 98-110.
264. Niemann, C.U. and A. Wiestner, *B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution*. *Semin Cancer Biol*, 2013. **23**(6): p. 410-21.
265. Davis, R.E., et al., *Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma*. *Nature*, 2010. **463**(7277): p. 88-92.
266. Minden, M.D.-v., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling*. *Nature*, 2012. **489**(7415): p. 309-312.
267. Leseux, L., et al., *Syk-dependent mTOR activation in follicular lymphoma cells*. *Blood*, 2006. **108**(13): p. 4156-62.
268. Lanemo Myhrinder, A., et al., *A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies*. *Blood*, 2008. **111**(7): p. 3838-3848.

269. 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.
270. Hadzidimitriou, A., et al., *Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases*. Blood, 2011. **118**(11): p. 3088-95.
271. Wilson, W.H., et al., *Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma*. Nat Med, 2015. **21**(8): p. 922-926.
272. Yan, H., et al., *A formal model for analyzing drug combination effects and its application in TNF- α -induced NF κ B pathway*. BMC systems biology, 2010. **4**(1): p. 50.
273. Holohan, C., et al., *Cancer drug resistance: an evolving paradigm*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(10): p. 714-26.
274. Rodrik-Outmezguine, V.S., et al., *mTOR Kinase Inhibition Causes Feedback-Dependent Biphasic Regulation of AKT Signaling*. Cancer Discovery, 2011. **1**(3): p. 248-259.
275. Mendoza, M.C., E.E. Er, and J. Blenis, *The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation*. Trends in Biochemical Sciences, 2011. **36**(6): p. 320-328.
276. O'Reilly, K.E., et al., *mTOR Inhibition Induces Upstream Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Activates Akt*. Cancer Research, 2006. **66**(3): p. 1500-1508.
277. Ma, J., et al., *Characterization of ibrutinib-sensitive and-resistant mantle lymphoma cells*. British journal of haematology, 2014. **166**(6): p. 849-861.
278. Kim, E.S. and S. Dhillon, *Ibrutinib: a review of its use in patients with mantle cell lymphoma or chronic lymphocytic leukaemia*. Drugs, 2015. **75**(7): p. 769-76.
279. Manne, B.K., et al., *Distinct pathways regulate Syk protein activation downstream of immune tyrosine activation motif (ITAM) and hemITAM receptors in platelets*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(18): p. 11557-11568.
280. Bernard, S., et al., *Inhibitors of BCR signalling interrupt the survival signal mediated by the micro-environment in mantle cell lymphoma*. Int J Cancer, 2015. **136**(12): p. 2761-74.
281. Liu, T.M., et al., *Hypermorphic mutation of phospholipase C, gamma2 acquired in ibrutinib-resistant CLL confers BTK independency upon B-cell receptor activation*. Blood, 2015. **126**(1): p. 61-8.
282. Wang, J., et al., *Ibrutinib, a Bruton's tyrosine kinase inhibitor, exhibits antitumoral activity and induces autophagy in glioblastoma*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR, 2017. **36**: p. 96.
283. MacGlashan, D., et al., *Inhibition of IgE-mediated Secretion from Human Basophils with a Highly Selective Bruton's Tyrosine Kinase, Btk, Inhibitor*. International Immunopharmacology, 2011. **11**(4): p. 475-479.
284. Huang, X., et al., *Prolonged early G(1) arrest by selective CDK4/CDK6 inhibition sensitizes myeloma cells to cytotoxic killing through cell cycle-coupled loss of IRF4*. Blood, 2012. **120**(5): p. 1095-1106.
285. Dean, J.L., A.K. McClendon, and E.S. Knudsen, *Modification of the DNA damage response by therapeutic CDK4/6 inhibition*. J Biol Chem, 2012. **287**(34): p. 29075-87.
286. Bista, R., et al., *Disulfiram overcomes bortezomib and cytarabine resistance in Down-syndrome-associated acute myeloid leukemia cells*. J Exp Clin Cancer Res, 2017. **36**(1): p. 22.
287. Mini, E., et al., *Cellular pharmacology of gemcitabine*. Ann Oncol, 2006. **17 Suppl 5**: p. v7-12.
288. Zinkel, S., A. Gross, and E. Yang, *BCL2 family in DNA damage and cell cycle control*. Cell Death Differ, 2006. **13**(8): p. 1351-9.
289. Lorsch, J.R., F.S. Collins, and J. Lippincott-Schwartz, *Fixing problems with cell lines*. Science, 2014. **346**(6216): p. 1452-1453.
290. Goodspeed, A., et al., *Tumor-Derived Cell Lines as Molecular Models of Cancer Pharmacogenomics*. Mol Cancer Res, 2016. **14**(1): p. 3-13.
291. Pan, C., et al., *Comparative Proteomic Phenotyping of Cell Lines and Primary Cells to Assess Preservation of Cell Type-specific Functions*. Molecular & Cellular Proteomics : MCP, 2009. **8**(3): p. 443-450.

292. Meyerson, M. and E. Harlow, *Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner*. *Molecular and Cellular Biology*, 1994. **14**(3): p. 2077-2086.
293. Junttila, M.R. and F.J. de Sauvage, *Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response*. *Nature*, 2013. **501**(7467): p. 346-54.
294. Llames, S., et al., *Feeder Layer Cell Actions and Applications*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2015. **21**(4): p. 345-53.
295. Wason, J.M., L. Stecher, and A.P. Mander, *Correcting for multiple-testing in multi-arm trials: is it necessary and is it done?* *Trials*, 2014. **15**: p. 364.
296. Rothman, K.J., *No adjustments are needed for multiple comparisons*. *Epidemiology*, 1990. **1**(1): p. 43-6.

Anhang



Anhang 1: PCR und Sequenzierung am Beispiel von fünf DLBCL Zelllinien zur Identifikation und zum Ausschluss von Verunreinigung der Zelllinien.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<u>Abbildung 1:</u> Schematische Darstellung des B-Zell Rezeptor Signalweges aus „J.M. Dal Porto et al. / <i>Molecular Immunology</i> 41 (2004) 599–613“	12
<u>Abbildung 2:</u> Versuchsaufbau „Wash-out“ am Beispiel Abemaciclib / Cytarabin. Versuche mit und ohne Wash-out wurden immer parallel durchgeführt. [...]	31
<u>Abbildung 3:</u> Schema einer 6-Well Platte bei den Wash-out Versuchen vor Verteilung der Zellen in die 96-Well Platte und vor Behandlung am Beispiel Cytarabin. [...]	31
<u>Abbildung 4:</u> Dosis-Effekt Kurven, berechnet mit CompuSyn[201]. Die Zellen wurden aufsteigenden Konzentrationen von Abemaciclib ausgesetzt und anschließend mittels trypanblau [...]	35
<u>Abbildung 5:</u> Will-2 und JeKo-1 behandelt mit 7,8125 – 125 nM Abemaciclib. Zellzahl gemessen mittels trypanblau Färbung nach 24, 48 und 72 h. [...]	36
<u>Abbildung 6:</u> DLBCL und MCL Zelllinien behandelt mit 62,5 nM Abemaciclib. Trypanblau Färbung (Vi-Cell XR) nach 24, 48 und 72 h. [...]	36
<u>Abbildung 7:</u> Viabilität gemessen anhand trypanblau Färbung (Vi-Cell XR). A) Die Viabilität der mit 62,5 nM Abemaciclib behandelten Zellen unterschied sich in keiner der [...]	37
<u>Abbildung 8:</u> JeKo-1 Zellen behandelt mit aufsteigenden Konzentrationen Abemaciclib, trypanblau Färbung (Vi-Cell XR). Aufgetragen ist das Verhältnis viabler Zellen [...]	37
<u>Abbildung 9:</u> Zellzyklusanalyse mittels PI-Färbung (Durchflusszytometrie). A) Auswirkungen auf den Zellzyklus der Zelllinie Maver-1 bei 31,25 und 62,5 nM Abemaciclib [...]	38
<u>Abbildung 10:</u> Zellzyklusanalyse mittels PI-Färbung (Durchflusszytometrie) der sensitiven MCL (Maver-1, JeKo-1, Mino) und DLBCL (Will-2) Zelllinien. [...]	39
<u>Abbildung 11:</u> Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie der resistenten MCL (Granta 519) und DLBCL (Hbl-1, U2932, DB) Zelllinien. [...]	40
<u>Abbildung 12:</u> Zelltodanalyse mittels Annexin V / 7AAD-Färbung (Durchflusszytometrie) nach 72 h Inkubation mit 31,25 bzw. 62,5 nM Abemaciclib. [...]	41
<u>Abbildung 13:</u> Messung des ATP-Gehalts behandelter Zellen (CellTiter-Glo) nach 48 h Inkubation. Zellen behandelt mit 31,25 und 250 nM Abemaciclib sowie mit [...]	43
<u>Abbildung 14:</u> Sequentielle Behandlung von MCL Zellen mit Abemaciclib und Ibrutinib. Nach 32 h Inkubation mit 31,25 nM Abemaciclib in 6-Well Platten [...]	44
<u>Abbildung 15:</u> Zellzyklusanalyse mittels PI-Färbung (Durchflusszytometrie) bei Mino und JeKo-1. Grün: G1/G0-Phase, Gelb: S-Phase, Blau: G2/M-Phase. [...]	45
<u>Abbildung 16:</u> Zellzyklusanalyse mittels PI-Färbung (Durchflusszytometrie) zu den Zeitpunkten 4 und 8 h (A) und 8 und 24 h (B). [...]	46
<u>Abbildung 17:</u> Messung des ATP-Gehalts (CellTiter Glo) nach verschiedenen Therapieschemata. JeKo-1, Maver-1, Mino, Granta 519 und Will-2 behandelt mit 123 [...]	47
<u>Abbildung 18:</u> Zellzählung und Bestimmung der Viabilität mittels trypanblau Färbung (Vi-Cell XR). Behandlung von Mino und JeKo-1 mit je 31,25 nM Abemaciclib und [...]	48
<u>Abbildung 19:</u> Zelltodanalyse mittels Annexin V / 7AAD-Färbung (Durchflusszytometrie). Mino Zellen behandelt mit 1,11 µM Cytarabin alleine (B) und ohne (C) oder mit (D) [...]	49

<u>Abbildung 20</u> : Zelltodanalyse mittels Annexin V / 7AAD-Färbung (Durchflusszytometrie). Mino und Granta 519 behandelt mit 31,25 nM Venetoclax für 48 h. [...]	51
<u>Abbildung 21</u> : Zellzyklusanalyse mittels PI-Färbung (Durchflusszytometrie). Mino und Granta 519 48 h nach Behandlung mit 500 nM LY3023414. [...]	52
<u>Abbildung 22</u> : Primäre Lymphozyten aus gesundem Spendervollblut gewonnen, behandelt mit A) Abemaciclib und Ibrutinib und B) Abemaciclib und Cytarabin. [...]	53
<u>Abbildung 23</u> : Patientenzellen behandelt mit 31,25 nM Abemaciclib, 250 nM Ibrutinib und der Kombination aus beiden. Messung nach 48 h mittels CellTiter-Glo. [...]	53
<u>Abbildung 24</u> : Patient 2 und Mino behandelt nach dem Wash-out Protokoll (Vgl. Kapitel 4.2.2) und gemessen mittels CellTiter-Glo. A) und B) [...]	54
<u>Abbildung 25</u> : Proteinexpression nach 24 h, gemessen mittels Western-Blot; beispielhaft an JeKo-1 und Granta 519 für Rb, ph.Rb(Ser795), CDK2, CDK4 und Cyclin D1. [...]	56
<u>Abbildung 26</u> : Proteinexpression nach 8 h, gemessen mittels Western-Blot für mTOR, ph.mTOR(Ser2448), Rictor und ph.Rictor(Thr1135). [...]	56
<u>Abbildung 27</u> : Proteinexpression nach 24 h, gemessen mittels Western-Blot, beispielhaft an JeKo-1 und Granta 519 für Akt, ph.Akt(Ser473), ph.Akt(Thr308), MEK1/2 und ph.MEK1/2(Ser217/221): [...]	56
<u>Abbildung 28</u> : Proteinexpression nach 24 h, gemessen mittels Western-Blot, beispielhaft an JeKo-1 und Maver-1 für Btk, ph.Btk(Tyr223), Syk und ph.Zap70(Tyr319)/Syk(Tyr352). [...]	57
<u>Abbildung 29</u> : Vergleich der Methoden 1 und 2 zur Darstellung des Wash-out Effekts bei Kombination von 62,5 nM Abemaciclib mit Cytarabin bei der Zelllinie Mino. [...]	74
<u>Anhang 1</u> : PCR und Sequenzierung am Beispiel von fünf DLBCL Zelllinien zur Identifikation und zum Ausschluss von Verunreinigung der Zelllinien.	90
<u>Tabelle 1</u> : Auszug aus der 2016-Revesion der WHO-Klassifikation lymphatischer Neoplasien[15].	3
<u>Tabelle 2</u> : Zusammenfassung der in dieser Arbeit benutzten small molecule Inhibitoren und ihrer maßgeblichen Wirkweisen. [...]	13
<u>Tabelle 3</u> : IC50-Konzentrationen, berechnet mit CompuSyn aus demselben Datensatz. Die Daten nach 24 h waren nicht sehr aussagekräftig, da [...]	35
<u>Tabelle 4</u> : Zelltodanalyse mittels Annexin V / 7AAD-Färbung (Durchflusszytometrie). Differenz der prozentualen Anzahl lebender, apoptotischer und frühapoptotischer Zellen [...]	41
<u>Tabelle 5</u> : Zusammenfassung der combination Indices (CI) aller getesteten Zelllinien. Berechnung des CI aus den in Abbildung 13 gezeigten Daten und den Daten der restlichen [...]	43
<u>Tabelle 6</u> : Zusammenfassung der CIs aller getesteten Zelllinien berechnet u.a. anhand der in Abbildung 14 gezeigten Daten. [...]	44
<u>Tabelle 7</u> : Combination Indices der Kombination Abemaciclib → Wash-out → Cytarabin der in Abbildung 17 A) gezeigten Daten. [...]	48
<u>Tabelle 8</u> : Combination Indices der Kombination Abemaciclib → → Cytarabin der in Abbildung 17 B) gezeigten Daten. [...]	48
<u>Tabelle 9</u> : Combination Indices für die MCL Zelllinien behandelt mit 31,25 nM Abemaciclib für 24 h und anschließend mit aufsteigenden Konzentrationen Idelalisib, Copanlisib oder IBL-301. [...]	50

Tabelle 10: *Combination Indices für MCL Zelllinien behandelt mit 31,25 nM Abemaciclib und Venetoclax bzw. LY3023414. Messung mittels CellTiter-Glo. [...]* **52**

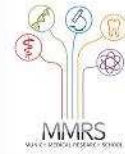
Tabelle 11: *Mann-Whitney Test der quantifizierten Proteine nach Western-Blot. K = Kontrolle, A = Abemaciclib.* **58**

Tabelle 12: *Quantitative Auswertung der mit Western-Blot gemessenen Proteinexpression. Zellen behandelt mit 31,25 nM Abemaciclib (A), 250 nM Ibrutinib (I) und der Kombination [...]* **59**



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Fischer, Luca

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Zielgerichtete Therapien beim Mantelzelllymphom – Der neue CDK4/6-Inhibitor Abemaciclib in Mono- und Kombinationstherapie

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

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

München, 24.06.2019

Ort, Datum

Luca Fischer

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand