# Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III

# Klinikum Großhadern der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt-Baildon

# In vitro Analysen neuartiger Medikamente im

# **Diffus großzelligen B-Zell Lymphom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Stephan Bayerl

aus Trostberg

Jahr 2021



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Martin Dreyling
Mitberichterstatter:	PD Dr. Markus Moser
	Prof. Dr. Sebastian Kobold
	PD Dr. Christian Wichmann
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. med. Anna Zöllner

Dekan:

Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung:

09.12.2021

# Eidesstattliche Versicherung

# Bayerl, Stephan

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

### In vitro Analysen neuartiger Medikamente im Diffus großzelligen B-Zell Lymphom

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

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

München, 16.12.2021

(Ort, Datum)

Stephan Bayerl

(Unterschrift Doktorand)

Meiner Familie, meiner Frau und meinen Freunden

# Inhaltsverzeichnis

1	Einle	eitung	1
	1.1	Klinik des DLBCL	1
	1.2	Morphologie/Geschichte der Klassifizierung	3
	1.3	Wichtige Signalwege in DLBCL	5
	1.4	Wichtige genetische Aberationen in DLBCL	10
	1.5	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Therapeutika	13
2	Ziels	etzung der Arbeit	15
3	Mat	erial und Methoden	16
	3.1	Material	16
	3.1.3	Zellinien	16
	3.1.2	2 Therapeutika	17
	3.1.3	8 Media, Lösungen, Verbrauchsmaterial	17
	3.1.4	l Geräte	19
	3.2	Methoden	21
	3.2.2	L Zellkultur	21
	3.2.2	2 Viabilitätszählung mittels Trypanblau-Ausschlusstest	24
	3.2.3	B Durchflusszytometrie	28
	3	2.3.1 Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid-Färbung	28
	3	2.3.2 Bestimmung der Apoptoserate mit Annexin V/ Propidiumiodid-Färbung	30
	3.2.4	Western Blotting	32
4	Erge	bnisse	35
	4.1	Viabilitätsversuche zur Dosisfindung mit Monosubstanzen	35
	4.1.1	Bortezomib	35
	4	1.1.1 ABC-Zelllinien	35
	4	1.1.2 GCB-Zelllinien	36
	4.1.2	2 Temsirolimus	37
	4	1.2.1 ABC-Zelllinien	37
	4	1.2.2 GCB-Zelllinien	38
	4.1.3	3 Ibrutinib	39
	4	1.3.1 ABC-Zelllinien	39
	4	1.3.2 GCB-Zellinnen	40
	4.1.4		41
	4	1.4.2 GCB-Zelllinien	41
	4.2	Viabilitätsversuche mit Substanzkombinationen	43
	4.2.3	Kombination Bortezomib mit Temsirolimus/ Ibrutinib/ Idelalisib	43
	4	2.1.1 ABC-Zelllinien	43
	4	2.1.2 GCB-Zelllinien	47
	4.2.2	2 Kombination Temsirolimus mit Ibrutinib/ Idelalisib	53
	4	2.2.1 ABC-Zelllinien	53
	4	2.2.2 GCB-Zelllinien	54
	4.2.3	s kompination ibrutinib mit ideialisib	56

	4.	.2.3.1 ABC-Zelllinien	56
	4.	.2.3.2 GCB-Zelllinien	57
	4.3	Ergebnisse Durchflusszytometrie	58
	4.3.1	1 Zellzyklusanalyse	58
	4.	.3.1.1 ABC-Zelllinien	58
	4.	.3.1.2 GCB-Zelllinien	59
	4.3.2	2 Apoptosemessung	60
	4.4	Ergebnisse Western Blotting	61
	4.4.1	1 ABC-Zelllinien	61
	4.4.2	2 GCB-Zelllinien	63
5	Disk	ussion	66
	5.1	Bortezomib	66
	5.2	Temsirolimus	67
	5.3	Ibrutinib	68
	5.4	Idelalisib	69
	5.5	Kombinationsversuche	71
	5.5.1	1 Kombinationsversuche mit Bortezomib	71
	5.5.2	2 Kombinationsversuche mit Temsirolimus	73
	5.5.3	3 Kombination Ibrutinib/Idelalisib	74
	5.6	Wissenschaftliche Einordnung	75
	5.7	Bezug zur Klinik	77
6	Zusa	ammenfassung	79
7	Bibli	iographie	81
8	Abkü	ürzungsverzeichnis	86
9	Verö	öffentlichte Teilaspekte der Arbeit	88
10	Dank	ksagung	89

# 1 Einleitung

### 1.1 Klinik des DLBCL

#### Epidemiologie:

Das Diffus großzellige B-Zell Lymphom (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) stellt mit einem Anteil von 30-40% die größte Fraktion der Non-Hodgkin Lymphome (NHL) dar; betrachtet man ausschließlich die aggressiv verlaufenden NHL steigt der Anteil auf 80–90%<sup>3</sup>. In einem global durchgeführten Projekt der International Lymphoma Study Group wurden 30,6% aus 1403 NHL-Fällen als DLBCL klassifiziert. Das mittlere Alter der Patienten betrug 64 Jahre mit einem Anteil männlicher Patienten von 55%<sup>4</sup>. Die Inzidenz der NHL einschließlich des DLBCL ist in den letzten Jahrzehnten parallel zur raschen Ausbreitung von HIV-Infektionen kontinuierlich angestiegen, zwischen 1980 und 2000 hat sich die Zahl der Neuerkrankungen in den Vereinigten Staaten sowie den meisten Ländern der westlichen Welt verdoppelt, unabhängig von Alter, Geschlecht und ethnischer Abstammung. Studien haben gezeigt, dass die HIV-Epidemie lediglich für ungefähr 50% der erhöhten Inzidenz verantwortlich gemacht werden kann und die Inzidenz der mit HIV- und KSHV- (Kaposi-Sarkom assoziiertes Herpesvirus) Infektionen einhergehenden NHL seit der Eindämmung der HIV-Epidemie und der Entwicklung suffizienter antiretroviraler Therapie rückgängig ist. Vielmehr steigt die Inzidenz HIV-unabhängiger Non-Hodgkin Lymphome, darunter auch DLBCL, ständig. Die Wahrscheinlichkeit, an einem NHL zu erkranken, steigt exponentiell ab dem 25. Lebensjahr und erreicht in hohen Altersgruppen ein Plateau. NHL kommen global ungleich verteilt vor. Hochentwickelte Länder haben eine höhere Inzidenz als Entwicklungsländer, dunkelhäutige Menschen sind um die Hälfte weniger betroffen als weiße. Die Erkrankung betrifft Männer häufiger als Frauen<sup>5</sup>. GLOBOCAN 2008 errechnete für NHL einen Inzidenzanteil von 2,8% an weltweit auftretenden Neoplasien mit einem kumulativen Risiko von 0,5%, an einem NHL vor Erreichen eines Alters von 75 Jahren zu erkranken. Das kumulative Mortalitätsrisiko liegt weltweit bei 0,3%; bei Männern bedeutet dies für neoplasiebedingte Todesfälle Rang 10, bei Frauen Rang 11. Betrachtet man die entwickelten, industrialisierten Länder (Nordamerika, Australien/Neuseeland, Japan und Europa), verdeutlicht sich die Bedeutung der NHL weiter ( $\Im$  Rang 7; ♀ Rang 9)<sup>6</sup>.

### Krankheitsbild:

Das DLBCL unterscheidet sich in seinem klinischen Erscheinungsbild nicht von anderen Non-Hodgkin Lymphomen. Symptome treten erst mit einiger Latenz zum Erkrankungsbeginn auf. Am häufigsten zeigt sich eine schmerzlose, an gut zugänglichen Lymphknotenstationen tastbare Vergrößerung eines Lymphknotens. Allgemeine Symptome wie Appetitlosigkeit, Müdigkeit und Übelkeit begleiten in einem

Drittel der Patienten die Erkrankung. B-Symptomatik tritt nur in ca. 20% der Fälle auf. Bei entsprechender spezieller Lokalisation, z. B. mediastinal, im Zentralen Nervensystem oder bei Knochenmarksinfiltration, kommen weitere organbezogene Symptome und Beschwerden hinzu<sup>7-9</sup>.

Für die Prognose der Patienten bezüglich Chancen auf Heilung oder Überleben der Krankheit wurde in einem globalen, retrospektiven Projekt der Internationale Prognostische Index (IPI) erarbeitet, der anschließend mehrfach prospektiv validiert wurde<sup>10</sup>. Der IPI hat eine Spanne von 0–5 Punkten. Bis einschließlich 1 Punkt wird das Risiko des Patienten als niedrig, 2 Punkte werden als niedrig-mittel, 3 Punkte als mittel-hoch, und  $\geq$  4 Punkte als hoch eingestuft. Für Patienten  $\leq$  60 Jahre existiert aktuell ein altersadaptierter IPI (aaIPI). Interessanterweise sind der IPI und der aaIPI momentan die einzig gültigen und klinisch praktikablen Möglichkeiten zur Risikostratifizierung der Patienten. Genexpressionsanalysen und Immunhistochemie sind derzeit entweder zu kostspielig oder noch nicht ausreichend auf ihre prospektive Validität geprüft. Erst die Hinzunahme des CD20-Antikörpers Rituximab Standard-Therapieregime CHOP (s. u.) führte zu zum einer deutlichen Prognoseverbesserung aller Gruppen, veränderte jedoch nicht das relative Risiko der IPI-Gruppen zueinander<sup>11, 12</sup>. Auch im Krankheitsrückfall und bei Behandlung mit einer Zweitlinientherapie behalten die Indizes ihre prognostische Signifikanz<sup>13</sup>.

### Therapie:

Vor Einleiten der Therapie wird der Patient mittels IPI risikostratifiziert und durch die Ann-Arbor-Klassifikation einem Stadium zugeordnet. Standardtherapie ist derzeit die Kombination aus 8 Gaben des CD20-Antikörpers Rituximab plus CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison) in 8 Zyklen im Abstand von 21 Tagen (R-CHOP21x8) oder in 6 Zyklen im 14-tägigen Abstand (R-CHOP14x6 + Rx8). Insbesondere bei Patienten unter 60 Jahren mit einem höheren Risiko (aaIPI ≥ 2) wird jedoch stets empfohlen, sie in klinische Studien einzuschließen, um möglicherweise einen größeren Therapieerfolg zu erzielen. Hierbei werden die Hinzunahme neu entwickelter Substanzen zur jetzigen Standardtherapie, andersartige Therapieregime und der Stellenwert sowohl von Hochdosischemotherapie mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation als auch von Bestrahlung befallener Regionen überprüft. Ca. 50% aller DLBCL-Patienten können mit der Standardtherapie kurativ behandelt werden, die andere Hälfte erleidet einen Rückfall oder spricht nicht auf die Erstlinientherapie an. Für diese Fälle existieren komplexe Studienprotokolle, auf die hier nicht weiter eingegangen werden kann. Der Therapieerfolg aller Zweit- und Drittlinientherapien ist stark beschränkt<sup>9, 14</sup>.

### 1.2 Morphologie/Geschichte der Klassifizierung

Die Einteilung der DLBCL veränderte sich in den letzten Jahrzehnten durch Einbeziehung neuer Möglichkeiten wie der Immunhistochemie sowie diagnostischer der Erstellung von Genexpressionsprofilen beständig. 1930 von Roulet als Retikulosarkom, 1966 von Rappaport als histiozytisches Lymphom (lokal) und als maligne Histiozytose (systemisch) bezeichnet, ist mit der Erkenntnis von Stein et al, dass diese Neoplasien von B-Zellen abstammen, der Weg zur Bezeichnung als Lymphome geebnet worden. Es entstanden die Begriffe der zentroblastischen und immunoblastischen Lymphome<sup>3</sup>. Die Kiel-Klassifikation bezog sich in der Einteilung auf den histologischen Differenzierungsgrad sowie auf das physiologische Zellkorrelat der Non-Hodgkin Lymphome, sodass DLBCL früher als großzellige, anaplastische B-Zell Lymphome bezeichnet wurden. Im angloamerikanischen Sprachgebrauch wurde mit der "Working Formulation" ab 1982 versucht, Non-Hodgkin Lymphome anhand ihres klinischen Verlaufes einzuteilen in drei Gruppen anhand der Überlebenszeiten der Patienten und deskriptiver Morphologie<sup>15</sup>. Der Durchbruch zu einem international gültigen System gelang 1994 durch die ILSG (International Lymphoma Study Group) in Form der Revised European-American Lymphoma (REAL-) Classification. Hier wurde zum ersten Mal der Begriff des DLBCL geprägt und dieses als eigenständige Entität anerkannt. Zwei Subtypen der DLBCL wurden ebenfalls zu diesem Zeitpunkt definiert: das primär mediastinale großzellige B-Zell Lymphom (PMBL) und das hochmaligne Burkitt-Lymphom-ähnliche B-Zell Lymphom. Der erstgenannte Subtyp besitzt ein eigenes charakteristisches Expressionsmuster von Oberflächenantigenen sowie spezifische genetische Veränderungen. Epidemiologisch auffällig sind zudem ein hoher Frauenanteil und das junge Alter der Patienten bei Erstmanifestation. Letzterer Subtyp beinhaltet Lymphome, die aufgrund von morphologischen und genetischen Eigenschaften sowie aufgrund ihrer Proteinexpressionsmuster nicht eindeutig als DLBCL oder Burkitt-Lymphom charakterisiert werden können<sup>16</sup>.

2001 wurde erstmals eine WHO-Klassifikation der malignen Lymphome erarbeitet und veröffentlicht, die durch moderne Analysetechniken hinzugewonnenen Erkenntnisse in die Einteilung einfließen ließ. Die Gruppe der Diffus großzelligen B-Zell Lymphome blieb ein eigenständiger Begriff, es wurde den Pathologen freigestellt, bei Diagnosestellung bestimmte morphologische Varianten (zentroblastisch, immunoblastisch, anaplastisch, Histiozyten-reich) mit anzugeben. Zwei weitere Varianten wurden erstmals beschrieben: die plasmablastische Variante und das DLBCL mit einer Expression von ALK. Durch Analyse von Genexpressionsmustern wurden durch verschiedene Arbeitsgruppen (Aliazadeh et al; Wright et al; Rosenwald et al) erstmals zwei prognostisch unterschiedliche Gruppen ausgemacht: das Germinal-centre like (GCB-) DLBCL und das Activated B-cell like (ABC-) DLBCL<sup>17-19</sup>. 2003 wurde auch ein spezifisches Muster für das PMBL entdeckt, was die morphologischen und klinischen Beobachtungen, dass es sich um einen eigenständigen Subtyp handelt, bestätigte<sup>20</sup>. Diese

Unterscheidung der drei Gruppen hat heute große Bedeutung und nimmt zunehmend Einfluss auf Behandlungsstrategien. Spezielle klinisch andersartig auftretende Subtypen der großzelligen B-Zell Lymphome wie das intravaskuläre und das primäre Erguss-Lymphom wurden 2001 in der Klassifikation aus der DLBCL-Kategorie ausgeschlossen<sup>16</sup>.

Die aktuell gültige Überarbeitung der WHO-Klassifikation stammt aus dem Jahr 2016, zuvor wurde die Klassifikation 2008 bereits einmal revidiert.

Die größte Gruppe der DLBCL bleibt demnach die der DLBCL-NOS (not otherwise specified). Zu dieser Gruppe werden alle DLBCL zugeordnet, die nicht einen speziellen klinischen Verlauf oder pathologische Besonderheiten aufweisen. Innerhalb der DLBCL-NOS wird durch Genexpressionsanalysen unterschieden in GCB- und ABC-Subtyp. Die 2001 noch mögliche Angabe morphologischer Varianten ist seit 2008 verlassen, zugunsten einer Subtypisierung anhand besonderer anatomischer Verläufe, genetischer Besonderheiten oder auch spezieller Kofaktoren wie einem auffälligen Mikromilieu oder charakteristischer viraler Koinfektionen. Hierzu gehören das PMBL, das DLBCL des ZNS, das primär kutane DLBCL vom Beintyp, das T-Zell-/ Histiozyten-reiche DLBCL, das ALK<sup>+</sup>-DLBCL, das plasmoblastische Lymphom, das HHV-8<sup>+</sup>- Lymphom (provisorische Entität), das großzellige B-Zell Lymphom und das intravaskuläre DLBCL. Verbunden mit einer EBV-Infektion sind die lymphomatoide Granulozytose, das EBV<sup>+</sup>-DLBCL und das EBV<sup>+</sup>-mukokutane Ulcus, wobei letzteres derzeit nur als provisorische Entität Einzug in die WHO-Klassifikation gehalten hat. Mit den Kategorien "hochgradiges B-Zell Lymphom, NOS" und "hochgradiges B-Zell Lymphom, mit *MYC*- und *BCL2*- und/oder *BCL6*-Translokation" wird den großzelligen B-Zell Lymphomen Rechnung getragen, die nicht klar den DLBCL zuzuordnen sind <sup>21-24</sup>.

# 1.3 Wichtige Signalwege in DLBCL



PI3K-AKT-mTOR-Signalweg:

Abbildung 1: Übersicht der bisher bekannten über- und untergeordneten Signalwege der beiden mTOR-Komplexe; Im Rahmen dieser Doktorarbeit von besonderem Interesse ist der PI3K-AKT-mTOR Signalweg, welcher rechts oberhalb von mTORC1 zu erkennen ist. Abbildung aus "mTOR signaling at a glance"; M. Laplante und D.M. Sabatini<sup>1</sup>

mTOR (mammalian target of rapamycin) agiert als "Verteilerstation", die viele vorgeschaltete extraund intrazelluläre Signale auf untergeordnete verschiedene Signalwege prozessiert. Das mTOR-Protein ist eine im Zytoplasma arbeitende Serin-Threonin-Kinase, die als katalytische Untereinheit an zwei Proteinkomplexen beteiligt ist: mTOR-Complex 1 (mTORC1) und mTOR-Complex 2 (mTORC2). Der bei Entdeckung beobachtete, entscheidende Unterschied zwischen beiden Komplexen ist, dass nur mTORC1 durch Rapamycin und entsprechende Analoga (sog. rapalogues) gehemmt werden kann. Ausnahmen hiervon sind neu entwickelte, mTOR-blockierende SMA (small molecule agents) sowie eine lang andauernde Behandlung mit Rapamycin.

Die weiteren Einheiten des mTORC1 sind das regulatory-associated protein of mTOR (Raptor), das mammalian lethal with Sec13 protein 8 (mLST8), das proline-rich AKT substrate 40kDa (PRAS40) und das DEP-domain-containing mTOR-interacting protein (Deptor). mTORC1 ist entscheidend für die Regulation der Stoffwechselaktivität der Zelle. Die Aktivität von mTOR wird durch den Phosphorylierungszustand von Raptor gesteuert, PRAS40 und Deptor sind in mTORC1 negative Regulatoren. mLST8 vermittelt zwischen Raptor und mTOR. mTORC1 regt die Proteinbiosynthese und ribosomale Prozessierung durch Stimulation von Translationsvorgängen an. Der Signalweg wird nach

extrazellulärer Stimulation mit Wachstumsfaktoren und durch Aktivierung des Antigen-Rezeptors aktiviert. In B-Lymphozyten ist dies der B-Zell-Rezeptor. Durch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) wird der Botenstoff PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-3,4,5,-triphosphat) generiert. PIP<sub>3</sub> rekrutiert die Serin-Threonin-Kinase AKT (auch Proteinkinase B, PKB, genannt) zur Zellmembran und in die Nähe von PDK1. Eine Zweifachphosphorylierung durch PDK1 und mTORC2 führt zu einer vollständigen Aktivierung von AKT. Eine negative Regulation ist mit PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) durch die Dephosphorylierung von PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub> möglich. Eine Formation aus TSC1 (tuberous sclerosis complex) und TSC2 kontrolliert die mTOR-Aktivität negativ. TSC2 hat zwei Untereinheiten, Harmatin und Tuberin. Tuberin hat verschiedene Phosphorylierungsstellen und kann aktivierend oder inaktivierend phosphoryliert werden. Letzteres geschieht durch AKT. Dadurch ist eine Formation mit TSC1 unmöglich, welche bis dahin die GTPase Rheb in der inaktiven GDP-gebundenen Form gehalten hat. Aktiviertes, GTP-gebundenes Rheb aktiviert anschließend mTORC1. Außer dem o. g. Signalweg hat AKT noch einen wichtigen TSC-unabhängigen Mechanismus der mTORC1-Aktivierung über die Phosphorylierung und daraus resultierende Dissoziation des negativen Regulators PRAS40 von mTORC1.

Als Integrator extrazellulärer Bedingungen in adäquate Zellproliferation, Wachstum und Stoffwechselaktivität jeder einzelnen Zelle muss mTOR dynamisch auf Veränderungen des Energiezustands des Gesamtorganismus reagieren können. Hierzu führen weitere Signalwege zu mTOR:

Eine Zytokinbindung oder die Bindung des anabolen Hormons Insulin an entsprechende Rezeptoren an der Zelloberfläche aktiviert mTORC1 über zwei verschiedene Wege. Zum einen wird GDP-ras zu GTP-ras phosphoryliert. Diese bindet und aktiviert die RAF-Kinase, welche ihrerseits MEK (syn. MAPK) phosphoryliert und aktiviert. Dadurch werden zwei Effektorkinasen aktiv, ERK und RSK. Beide phosphorylieren und inaktivieren TSC2, wodurch, wie oben beschrieben, der TSC1/TSC2-Zusammenschluss nicht mehr möglich ist und mTORC1 aktiviert wird. RSK hat zusätzlich über die Phosphorylierung von Raptor direkt aktivierenden Einfluss auf mTORC1. ERK wiederum aktiviert MNK1 und MNK2, welche auf direktem Weg elF4E (s. u.) phosphorylieren.

Zum anderen rekrutiert die Bindung von Insulin und IGF1 an die Oberflächenrezeptoren das insulin receptor substrate 1 (IRS1) und aktiviert PI3K, wodurch PIP<sub>3</sub> gebildet wird. Dieses rekrutiert AKT und aktiviert es über die Phosphoylierung durch PDK1 und verstärkt die o.g. Effekte von AKT. An IRS1 greift ein wichtiger negativer Rückkopplungsmechanismus. Bei einer mTORC1-Aktivierung wird p70S6-Kinase aktiviert, die folglich IRS1 phosphoryliert, welches dadurch instabil und unwirksam wird.

Bei niedrigem ATP/ADP-Quotienten wird die AMP-activated protein kinase (AMPK) aktiviert, Hypoxie setzt den Hypoxia-inducible Factor (HIF) frei und führt zur Bildung von REDD1. Sowohl AMPK als auch REDD1 verstärken durch Phosphorylierung von Tuberin die Wirkung des TSC1/TSC2-Komplexes. Außerdem wurde gezeigt, dass die Präsenz von Leucin und Glutamin Voraussetzung ist für eine perinukleäre, Rheb-nahe Position von mTORC1. Gesteuert wird dies über die Familie der rag-Proteine, die abhängig von o. g. Aminosäuren an Raptor binden und so die Lokalisation von mTORC1 ändern können.

Das Tumorsuppressorprotein p53 nimmt mehrfach Einfluss auf die mTOR-Aktivität. Es führt zu einer Aktivierung negativ regulierender Proteine des mTOR-Signalweges, u. a. von PTEN, TSC2 und AMPK. Außerdem sind mehrere Rückkopplungswege beschrieben, z. B. dephosphorylieren mTORC1 und AKT (über MDM2) p53, AMPK verstärkt durch Phosphorylierung das p53-Signal.

Verschiedene immunologische oder metabolische Signale sind so bei mTOR angelangt und werden durch zwei Effektorkinasen weiter verschalten: die Serin/Threonin-Kinase p70S6K1 und das Protein 4EBP1 (eucaryotic translation initiation factor 4E-binding protein). Eine aktivierte p70S6K phosphoryliert ihrerseits das 40S ribosomale Protein S6, wodurch die mRNA-Translation von weiteren ribosomalen Proteinen, Elongationsfaktoren und IGF-2 (insulin-like growth factor 2) initiiert wird.

4EBP1 bindet den elF4E (eukaryotic translation factor 4E). Nach Phosphorylierung dissoziiert 4EBP1 und anschließend wird durch elF4E und weitere Faktoren dieser Familie die Translation von Proteinen, die für die Zellzyklusregulation entscheidend sind, z. B. c-myc und Cyclin D1, ermöglicht.

mTOR, mLST8 und Deptor bilden zusammen mit drei weiteren Proteinen mTORC2: rapamycin-insensitive companion of mTOR (Rictor), mammalian stress-activated protein kinase interacting protein (mSin1) und protein observed with Rictor-1-protein (Protor-1). Die Aufgaben von mTORC2 sind aktuell nicht derart detailliert entschlüsselt wie bei mTORC1, sind jedoch mit Kontrolle von Apoptose, Proliferationsrate, Stoffwechselaktivität und Organisation des Zytoskeletts ähnlich. Es ist bekannt, dass mTORC2 AKT phosphoryliert. Zusammen mit einer zweiten Phosphorylierung durch die phosphoinositide dependent kinase 1 (PDK1) führt dies zu verstärkter Stoffwechselaktivität in der Zelle. Die Signalwege, von denen mTORC2 selbst beeinflusst wird, sind weitestgehend unklar<sup>1, 25-28</sup>.



NF-kB- (nuclear factor kappa B) Signalweg:

Abbildung 2: Übersicht über T-Zell- und B-Zell-Rezeptor-Signalweg in den jeweiligen Lymphozyten; Für diese Doktorarbeit ausschließlich relevant ist der mit "B" gekennzeichnete B-Zell-Rezeptor-Signalweg. Abbildung aus "Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B"; Schulze-Luehrmann, J. und Ghosh, S.<sup>2</sup>

Ähnlich wie der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg ist auch NF-KB bedeutend für die Reifung und Regulation von Lymphozyten. NF-KB selbst ist die Bezeichnung für eine Familie aus fünf Proteinen (RelA, RelB, c-Rel, NF-KB1 und NF-KB2), die unterschiedlich kombiniert als Transkriptionsfaktor fungieren. NF-KB kommen in ihrer inaktiven Form in allen humanen Zellen im Zytosol vor und wechseln nach Aktivierung in den Zellkern, wo sie meist eine Verstärkung der Transkription, selten auch eine Unterdrückung der Transkription ihrer Zielgene erwirken. In B-Lymphozyten ist die Aktivierung des B-Zell-Rezeptors der wichtigste Ausgangspunkt der NF-kB-Aktivierung. Die Signaltransduktion läuft über ein komplexes System intrazellulärer Proteinmodulationen und ist auf einem klassischen, genannt kanonischen und einem alternativen Signalweg möglich. Endpunkt beider Wege ist eine Inaktivierung von Proteinen der IkB-Familie, die NF-kB-Proteine so maskieren, dass sie nicht in den Zellkern gelangen und dort nicht an DNA binden können. Der klassische Signalweg beginnt mit der Aktivierung des B-Zell-Rezeptors. Ein erster Schritt ist die Dephosphorylierung von Kinasen der Src-Familie (SFK) durch die Phosphatase CD45. Die dadurch aktivierten SFKs phosphorylieren die cytosolisch gelegenen immunoreceptor tyrosine kinase motifs (ITAMs) der Ig $\alpha$ - und Ig $\beta$ -Ketten des B-Zell-Rezeptors. Dadurch wird Syk rekrutiert und phosphoryliert das Adaptorprotein SLP65, das nun weitere Kinasen an sich bindet und Interaktionen ermöglicht. Wichtige Moleküle hierbei sind die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die Phospholipase Cy (PLCy) und die Bruton's Tyrosin Kinase (BTK). Durch diesen gebundenen Multiproteinkomplex werden PI3K und PLCγ aktiviert. Die PLCγ generiert Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) sowie Diacylglycerol (DAG). Letzteres führt in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen zu einer Aktivierung der Proteinkinase Cβ (PKCβ).Die aktivierte PI3K rekrutiert die Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1 (PDK1), die PKCβ sowohl phosphorylieren als auch von PKCβ phosphoryliert werden kann. PDK1 scheint eine große Bedeutung im B-Zell-Rezeptor-Signalweg zu besitzen und ist verantwortlich für die Rekrutierung und Weiterleitung des Signals an den Proteinkomplex CBM- (CARMA1, BCL10, MALT1) Signalosom. CARMA1, auch genannt CARD11, kann erst nach einer Phosphorylierung durch die PKCβ am CBM-Komplex teilhaben. Der CBM-Komplex aktiviert schließlich über den TNF-Rezeptor assozierten Faktor 6 (TRAF6) den IκB-Kinase-Komplex (IKK-Komplex), der die IκBα-phosphoryliert und ihren Abbau im Proteasom einleitet. Damit ist der Weg frei für die NFκ-B, die nun in den Nucleus gelangen, dort an DNA binden und Transkriptionsvorgänge beeinflussen<sup>2, 29</sup>.

#### Verbindung zwischen den Signalwegen:

Eine adäquate Reaktion der Zelle auf extrazelluläre Signale erfordert ein gleichgerichtetes Arbeiten der beiden oben genannten und vieler weiterer Signalwege. Beide Signalwege werden unter anderem beginnend am B-Zell-Rezeptor aktiviert. Weit oben in den Signalkaskaden finden sich PI3K, BTK und PDK1, die eine zentrale Rolle im Beginn beider Signalwege einnehmen. Aber auch im Verlauf der Signalwege gibt es beschriebene Quervernetzungen und Interaktionen zwischen der PI3K-AKT-mTOR-Achse und dem NF-κB-Signalweg. So ist IKKβ beispielsweise eine zentrale Kinase weit unten im klassischen B-Zell-Rezeptor-Signalweg zu NF-κB, phosphoryliert nach Aktivierung jedoch auch direkt TSC1, sodass mTOR aktiviert wird. Durch proinflammatorische Zytokine, z. B. TNFα, werden ebenfalls beide Signalwege beeinflusst<sup>2, 25, 30</sup>. Ein Eingreifen an einer einzelnen Kinase ist durch Querverbindungen und Rückkopplungen in den Signalwegen erwartungsgemäß als Therapieoption nicht zielführend. So löst beispielsweise eine Inhibition von BTK durch Ibrutinib eine kompensatorische Hochregulation von AKT aus, wodurch eine Aktivierung von mTOR stattfinden kann<sup>31</sup>.

### 1.4 Wichtige genetische Aberationen in DLBCL

Während der Reifung von B-Zell-Vorstufen zu reifen B-Zellen und Plasmazellen entstehen auf dem Weg zum DLBCL charakteristische genetische Läsionen, denen eine große Bedeutung in der Pathogenese dieser Lymphome zugesprochen wird. Fehler in der somatischen Rekombination führen zu drei beobachteten Translokationen in DLCBL, jeweils den *IgH*-Genlokus betreffend:

Zum einen die Translokation t(14;18) mit der daraus resultierenden Nachbarschaft des *BCL2*-Gens und des *IgH*-Lokus. Diese wurde in vielen (20–35%) GCB-DLBCL beobachtet, in einigen primär mediastinalen großzelligen B-Zell-Lymphomen, jedoch nie in ABC-DLBCL. Die Interpretation der Konsequenzen dieser Translokation ist schwierig: Einerseits waren die mRNA-Level von BCL2 nicht signifikant erhöht in DLBCL mit t(14;18). In Fällen ohne Translokation, jedoch mit Punktmutationen, die auch in anderen Subtypen des DLBCLs beschrieben werden, sind die BCL2-mRNA-Level teilweise wiederum erhöht. Andererseits ist die Konsequenz der Translokation für die Onkogenese und Tumorbiologie momentan nicht eindeutig zu erfassen, weil das *BCL2*-Gen für eine Proteinfamilie kodiert, die sowohl pro- als auch antiapoptotische Komponenten enthält. Möglicherweise ist die Translokation funktionell als initiales Ereignis in der Lymphomgenese der GCB-DLBCL wichtig, jedoch durch zusätzliche Läsionen nicht mehr notwendig für das weitere Tumorzellüberleben<sup>17, 32, 33</sup>.

Zum anderen wurden in allen molekularen Subtypen der DLBCL unterschiedlich häufig Translokationen des *BCL6*-Gens (ABC: 24%, GCB: 10%, PMBL 33%) entdeckt<sup>34</sup>. Ein Teil der Translokationen erfolgt als t(3;14) und bringt den *BCL6*-Lokus unter die Kontrolle des *IgH*-Lokus-Promotors. Interessanterweise hat keine der verschiedenen *BCL6*-Translokationen eine messbare Konsequenz auf die mRNA- und Protein-Level von BCL6 in DLBCL. Zusätzlich zu Translokationen ist *BCL6* auch zahlreichen Mutationen während der somatischen Hypermutation (SHM) ausgesetzt. Es handelt sich um Punktmutationen einzelner Basen. *BCL6* ist auf dem Chromosomabschnitt 3q27 lokalisiert und kodiert für das gleichnamige BCL6-Protein, das die Transkription zahlreicher Proteine in verschiedenen Signalwegen unterdrückt. Physiologisch werden Gene des Apoptoseprogramms (z. B. *p53*-Tumorsuppressorgen, *PIAS2-STAT2*), der Wachstumshemmung, sowie der B-Zell Aktivierung (*CD69, STAT1, CD80*) und der Differenzierung zu Plasmazellen durch BCL6 in ihrer Transkription gehindert. Diese Repression ist vor allem, aber nicht ausschließlich, im GCB-Subtyp beschrieben. Für die Ausformung des Keimzentrums ist BCL6 zwingend erforderlich. Aktuell ist davon auszugehen, dass *BCL6*-Mutationen in der Lymphomentstehung, nicht aber in der weiteren Tumorbiologie entstandener DLBCL eine wichtige Rolle spielen<sup>3, 34-38</sup>.

Ein kleiner Teil der DLBCL weist eine Translokation t(3;14) auf, die unter anderem das *FOXP1*-Gen unter die Kontrolle des *IgH*-Lokus stellt. Die Folge ist eine vermehrte Expression von FOXP1, einem

Transkriptionsfaktor. Ebenfalls zu einer deutlich gesteigerten *FOXP1*-Expression, die ein Kennzeichen des ABC-Subtyps ist, führt die Trisomie 3, die in ca. 25% der ABC-DLBCL beobachtet wird. Weitere Mechanismen in anderen Fällen, die zu einer vermehrten Expression führen, sind Amplifikationen des *FOXP1*-Gens oder dessen gesteigerte Transkription. Die onkogenen Mechanismen hinter den Veränderungen auf dem p-Arm des Chromosoms 3 sind noch nicht vollständig erforscht. Fest steht, dass FOXP1 als Transkriptionsfaktor von *RAG1* und *RAG2* (recombination activating gene) in der somatischen Rekombination eine wichtige Rolle spielt. Ohne die Anwesenheit von FOXP1 ist der Entwicklungsschritt von der pre-B-Zelle zur pro-B-Zelle nicht möglich. Bezüglich der Tumorbiologie wurde im Modell gezeigt, dass die Funktion des FOXP1-Proteins durch die p70S6-Kinase und damit durch den PI3K-AKT-mTOR-Signalweg gesteuert werden könnte, da alle Proteine dieser Transkriptionsfaktorfamilie durch Phosphorylierung den Zellkern verlassen<sup>39-43</sup>.

In GCB-DLBCL wurde in 10–15% eine Deletion des langen Arms von Chromosom 10 beobachtet. Auf diesem Abschnitt liegt das *PTEN*-Gen. Das gleichnamige Protein katalysiert den Abbau von intrazellulärem PIP<sub>3</sub>, welches durch die aktive Form der PI3-Kinase aus PIP<sub>2</sub> gebildet wird. PIP<sub>3</sub> aktiviert AKT, sodass für die Zelle wichtige antiapoptotische Signalwege angestellt werden. Durch die Deletion des *PTEN*-Gens verliert PI3K seinen physiologischen Gegenspieler. PTEN wird posttranskriptional von einem Verbund mehrerer microRNAs intrazellulär negativ reguliert (miR-17-92-Cluster). Diese werden an einem Ort des Chromosoms 13 kodiert, der in mehr als 10% der GCB-DLBCL vervielfacht vorgefunden wird. Dadurch wird die PTEN-Funktion in einem weiteren nicht unbeachtlichen Teil des GCB-Subtyps beeinträchtigt, was sicher zur Lymphomgenese in diesen Fällen beiträgt. Ebenfalls zu einem Ungleichgewicht im PIP<sub>3</sub>-Haushalt führt eine Mutation in *p110-α*, einer katalytischen Untereinheit der *PI3K*, die in 8% einer DLBCL-Probensammlung mit 215 Proben nachgewiesen wurde und zu einer vermehrten protoonkogenen Aktivität des o.g. Signalwegs über AKT führt<sup>36, 39, 44-46</sup>.

Als weiteres Tumorsuppressorprotein wurde BLIMP1 identifiziert, das durch die Repression diverser Zielgene die Voraussetzungen schafft für eine vollständige B-Zell-Differenzierung zu Plasmazellen. In 25% der ABC-DLBCL wurden *PRDM1*-Mutationen festgestellt, die zu einem Funktionsverlust des daraus kodierten BLIMP1-Proteins führten. Im Signalweg von BLIMP1 wurden zusätzlich in weiteren 25% der ABC-DLBCL eine Vermehrung oder Wirkungsverstärkung von SPIB beobachtet, wiederum resultierend in einer Repression von BLIMP1 und einem Differenzierungsstopp. Mit BCL6 bildet BLIMP1 einen negativen Rückkopplungskreislauf. Durch o. g. Mutationen in *BCL6* wird die Signalkaskade auch bei physiologischer BLIMP1-Aktivierung über NF-κB und IRF4 nicht suffizient weitergeleitet und die Differenzierung ist wiederum nicht möglich. Insgesamt sind somit in einem Großteil des ABC-Subtyps Pathologien in Zusammenhang mit dem BLIMP1-Signalweg beschrieben<sup>36, 47, 48</sup>.

Die Notwendigkeit der Präsenz von AID (Activation-induced cytidine deaminase) an den genetischen Veränderungen der DLBCL wurde im Mausmodell bewiesen. Ohne die Funktionalität von AID können sich keine Lymphome aus Keimzentrums-B-Zellen entwickeln. Physiologisch ist AID für die Einleitung der somatischen Hypermutation und der CSR (class switch recombination) durch eine Deaminierung von Cytidin in DNA verantwortlich, mit der Konsequenz von DNA-Strangbrüchen und darauffolgenden Reparaturmechanismen, die zu physiologisch, aber auch pathologisch somatischen Mutationen führen können. Benötigt wird dieser Mechanismus vor allem zur Erhöhung der Affinität von Immunglobulinen in sich differenzierenden B-Zellen am *IgH*-Lokus. Bei nicht veränderten Gen- und Proteinmengen bleibt die Frage offen, welchen Stellenwert AID in der DLBCL-Genese einnimmt. Eine Möglichkeit ist, dass beispielsweise durch die erhöhte Stressresistenz der Zellen, bedingt u. a. durch *BCL6*-Expression, AID-abhängige Mechanismen länger angeschaltet bleiben als während der physiologischen Differenzierungsreaktion und somit das Zeitfenster für die Akkumulation pathologischer Mutationen länger offen bleibt<sup>49</sup>.

Ein entscheidender Unterschied zwischen ABC- und GCB-DLBCL ist die chronische Aktivität des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs im ABC-Subtyp. Dieser Signalweg wird physiologisch in B-Zellen angeschaltet, die eine Antigen-getriggerte Aktivierung des B-Zell-Rezeptors erfahren. Die Signalkaskade läuft über die Phosphorylierung der CD79-Untereinheiten durch die Src-Kinase, Aktivierung der Syk-Kinase und darauffolgend der Bruton's Tyrosine Kinase sowie der Proteinkinase CB. Diese phosphoryliert CARD11 und führt zu einem Zusammenschluss von CARD11, BCL10 und MALT1 zu einem Proteinkomplex (CBM-Komplex), der schließlich NF-KB über eine Signalkaskade aktiviert. Einige der genannten beteiligten Proteine und Kinasen weisen speziell im ABC-Subtyp Mutationen ihrer Genloki auf. 10% der ABC-DLBCL haben eine CARD11-Mutation, die dazu führt, dass die Signalkaskade auch ohne Aktivierung des B-Zell-Rezeptors permanent abläuft. In ABC-DLBCL-Zelllinien mit dieser Mutation war eine gezielte Inaktivierung durch shRNA von Komponenten, die in der Signalkaskade höher lagen, ohne Wirkung. Die Untereinheiten des B-Zell-Rezeptors (BCR), CD79A und CD79B zeigen ebenfalls bei 21% der ABC-DLBCL hauptsächlich Punktmutationen in den ITAMs (Immunoreceptor-tyrosine-based activation motifs). Der Großteil dieser Mutationen liegt auf CD79B, die Folge ist eine vermehrte Expression des BCR und die Repression von Lyn, der einzigen bis dato bekannten Kinase, die eine negative Rückkopplung in der B-Zell-Rezeptor-Aktivierung vermittelt. Als funktionelle Konsequenz wird vermutet, dass die Chance einer positiven Selektion für maligne B-Zellen mit ITAM-Mutationen durch Herabsetzen der Reizschwelle steigt und weitere pathologische Mutationen hinzukommen können<sup>50</sup>.

### 1.5 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Therapeutika

### Bortezomib:

Bortezomib ist eine borhaltige Aminosäure, die das intrazelluläre 26S Proteasom der Zelle reversibel hemmt. Ist das Proteasom, das mehrere katalytische Einheiten besitzt, blockiert, wird die Degradierung von eukaryoten ubiquitinierten Proteinen verhindert. Davon betroffen sind auch zahlreiche wichtige regulatorische Proteine, die Zellzyklus, -wachstum und -metabolismus steuern, u. a. p53, IKB und verschiedene Zykline. Die Prozessierung dieser Proteine durch das Proteasom führt zu einer Aktivierung antiapoptotischer Signalwege als Stressantwort. Ist das Proteasom blockiert, wird eine adäquate Antwort der Zelle auf externe Stressoren wie Chemotherapie und Bestrahlung verhindert. Somit wird die Tumorzelle durch Bortezomib beispielsweise auch für Chemotherapie sensibilisiert. Klinisch zeigen sich bei Monotherapie mit Bortezomib mäßige Erfolge, in Kombination mit Chemotherapie jedoch beeindruckende Effekte. Dies wurde besonders bei mehrfach vorbehandelten Patienten mit Multiplem Myelom gezeigt. Durch die Hinzunahme von Bortezomib zum R-CHOP-Regime im unbehandelten DLBCL wird der derzeitige Überlebensnachteil der ABC-Gruppe ausgeglichen. Ein starker Vorteil im ABC-Subtyp zeigte sich auch bei Patienten mit Rezidiv oder therapierefraktärem DLBCL durch die Kombination Bortezomib plus DA-EPOCH. Die Toxizität von Bortezomib betrifft vor allem das Nervensystem, ist aber auch in Kombinationsbehandlungen meist tolerabel. Zugelassen ist Bortezomib aktuell zur Therapie des Mantelzelllymphoms und des Multiplen Myeloms<sup>51-55</sup>.

#### Temsirolimus:

Temsirolimus (syn. Torisel; CCI-779) ist ein löslicher Ester des natürlich vorkommenden Stoffes Rapamycin. Rapamycin ist für seine immunsuppressive Wirkung bekannt. Temsirolimus wurde 1999 von der FDA zunächst zugelassen zur Behandlung der akuten Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation. In den nächsten Jahrzehnten wurde ausgiebig die antiproliferative Wirkung in soliden Tumoren erforscht. Es konnte gezeigt werden, dass Temsirolimus und sein Metabolit Sirolimus spezifisch die mTORC1-Einheit des mTOR-Komplexes inhibieren und dadurch Angiogenese und Proliferation der Tumoren verzögern. Der Erfolg war in vielen soliden Tumoren als Monotherapie mäßig, lediglich bei Patienten in schlechtem Allgemeinzustand mit metastasiertem Nierenzellkarzinom zeigte sich ein deutlicher Überlebensvorteil im Vergleich zur IFN-α-Standardtherapie. Hierfür erhielt Temsirolimus 2007 in den USA und Europa die Zulassung. Häufige Nebenwirkungen der Therapie sind Stomatitis, Übelkeit und Husten. Schwere Nebenwirkungen (Grad 3/4) treten selten auf und sind zumeist eine reversible Suppression des Knochenmarks (Anämie, Thrombozytopenie), teils auch eine Chemotherapie-assoziierte Pneumonitis. Da mTOR an zahlreichen Stoffwechselvorgängen regulierend beteiligt ist, kommt es auch zu Entgleisungen im Zucker- und Fettstoffwechsel. Mittlerweile ist Temsirolimus auch zur Behandlung des therapierefraktären oder rezidivierten Mantelzelllymphoms zugelassen. Der Effekt der Temsirolimus-Monotherapie in DLBCL bei Versagen der Erstlinientherapie ist gering (OR 28,1%), bei Mantelzelllymphomen etwas besser (OR 38%)<sup>56-58</sup>.

### Ibrutinib:

Ibrutinib (syn. PCI-32765) ist ein Tyrosinkinaseinhibitor, der 2007 synthetisiert wurde. Es hemmt durch die kovalente Bindung an einem Cysteinrest (Cys-481) der Bruton's Tyrosin Kinase (BTK) diese irreversibel. Dieser Effekt wurde spezifisch in B-Zellen beschrieben. Im Mausmodell wurden Autoimmunerkrankungen durch Ibrutinib unterdrückt und zunächst an Hunden eine partielle Remission von B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen erfolgreich erprobt. Bei Patienten mit refraktärem oder wieder aufgetretenem Mantelzelllymphom wurden durchschlagende Erfolge erzielt, sodass Ibrutinib im November 2013 für diese Indikation in einem beschleunigten Verfahren die Zulassung erhielt. Ebenso ist Ibrutinib aktuell zugelassen zur Behandlung der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) und des Morbus Waldenström. Häufig beobachtete Nebenwirkungen der Monotherapie sind gastrointestinale und respiratorische Beschwerden, stets leichteren Ausmaßes. Schwere Nebenwirkungen sind selten, vor allem Neutropenie, Thrombozytopenie und eventuell eine erhöhte Blutungsneigung spielen hier ein Rolle<sup>59, 60</sup>.

Idelalisib:

Idelalisib (syn. CAL-101) ist ein Inhibitor der PI3K, mit einer starken Selektivität für die katalytische p110δ-Untereinheit gegenüber den weiteren drei Untereinheiten. Diese Untereinheit ist vor allem in den hämatologischen Zellen, insbesondere in Leukozyten exprimiert. Der Effekt ist eine Signalreduktion des PI3K-AKT-mTOR-Signalwegs durch eine fehlende AKT-Phosphorylierung am Serin473. Außerdem scheint Idelalisib die Einflüsse chemotaktischer Reize des Mikromilieus (z. B. TNF- $\alpha$ , BAFF) zu unterbinden<sup>61, 62</sup>. Idelalisib ist seit 2014 zur Therapie eines Rezidivs des Follikulären Lymphoms zugelassen, es konnten in mehreren Studien gute Ergebnisse erzielt werden (z. B. 2017: OR 57%)<sup>63</sup>.

# 2 Zielsetzung der Arbeit

Die wissenschaftlichen Erkenntnisse zum DLBCL nahmen in den letzten zehn Jahren rasch zu, insbesondere die Möglichkeiten der Genexpressionsanalyse und die damit verbundene Unterscheidung zwischen ABC- und GCB-Subtyp sind derzeit im Fokus. Seit der Einführung von R-CHOP als Standardtherapie des DLBCL in den 2000er Jahren konnte zwar eine deutlich höhere Heilungsrate erzielt werden, jedoch erleidet immer noch ein relevanter Anteil der Patienten einen Rückfall. Für diese Patienten gibt es nur noch sehr beschränkte oder hochaggressive Therapieregime. Durch die Erkenntnisse über zentrale Kinasen und deren Bedeutung in wichtigen Signalwegen verschiedener Tumorentitäten konnten neuartige Medikamente entwickelt werden, welche gezielt als Kinaseinhibitoren eingesetzt werden. Vor dem Hintergrund der für DLBCL wichtigen Signalwege sowie der Unterteilung der DLBCL in Subtypen sollen im Rahmen dieser Doktorarbeit und innerhalb unserer Arbeitsgruppe einige dieser neuartigen Medikamente einzeln und kombiniert an verschiedenen DLBCL-Zelllinien beider Subtypen in vitro erprobt werden. Das Verhalten der Zelllinien soll auf Proliferations-, Zellzyklus- und Proteinexpressions-Ebene untersucht und in Relation zur Studienlage bewertet werden. Im Falle positiver Ergebnisse könnten lohnenswerte, in die klinische Anwendbarkeit sinnvoll umsetzbare Kombinationen benannt werden.

# 3 Material und Methoden

# 3.1 Material

# 3.1.1 Zelllinien

Name der	Patienten-	Geschlecht	Proben-	Verdopplungs-	Genalterationen
Zelllinie	alter (a)		material	zeit (h)	
DB	45	männlich	Aszites	50	t(14;18), betrifft <i>IgH, bcl2</i>
HT	70	männlich	Aszites	30–40	p53-Mutation
SU-DHL 4	38	männlich	Aszites	40	t(14;18), betrifft <i>IgH, bcl2</i>
SU-DHL 5	17	weiblich	Lymphknoten	40	hyperdiploid
ULA	57	männlich	Aszites	40–60	t(14;18), betrifft <i>IgH, bcl2</i>
WILL-2	63	männlich	Aszites	20	t(14;18), betrifft <i>IgH</i> , <i>bcl2</i>
					t(8;22), betrifft <i>MYC-IgL</i>

Germinal-center B-cell like (GCB-) DLBCL (Laboreigene Zellbank; ehemals bezogen von Leibniz Institute DSMZ):

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten GCB-DLBCL-Zelllinien

Die Zelllinie DB ist eine reife B-Zell-Zelllinie aus Aszites eines 45-jährigen Patienten mit primärem DLBCL und trägt Alterationen auf *IGH*- und *BCL2*-Genen. Mit etwa 50 Stunden Verdopplungszeit ist DB eine der verwendeten Zelllinien, die relativ langsam proliferieren<sup>64</sup>.

HT wurde 1983 als reife B-Zell-Zelllinie aus Aszites eines 70-jährigen Patienten mit NHL aus primärem DLBCL gemischt mit kleinzelligem B-Zell Lymphom etabliert, Verdopplungszeit 30–40 Stunden<sup>64</sup>.

SU-DHL steht für "**S**tanford **U**niversity and **D**iffuse **H**istiocytic **L**ymphoma", in dieser Arbeit verwendet wurden die Zelllinien SU-DHL 4 und SU-DHL 5.

SU-DHL 4 ist eine reife B-Zell-Zelllinie aus Aszites eines 38-jährigen Patienten mit primärem DLBCL. Sie trägt Alterationen auf den *IGH*- und *BCL2*-Genen<sup>64</sup>.

SU-DHL 5 ist etabliert als reife B-Zell-Zelllinie aus Lymphknoten einer 17-jährigen Patientin mit primärem DLBCL<sup>64</sup>.

ULA entstand 2002 als reife B-Zell-Zelllinie aus Aszites eines 57-jährigen Patienten mit primärem DLBCL, Verdopplungszeit 40–60 Stunden<sup>64</sup>.

WILL-2 ist eine reife B-Zell-Zelllinie aus Aszites einer 63-jährigen Patientin mit primärem DLBCL mit Alterationen der *MYC-, IGL-* und *BCL2-*Gene<sup>64</sup>.

Name der	Patienten-	Geschlecht	Probenmaterial	Verdopplungs-	Genalterationen
Zelllinie	alter (a)			zeit (h)	
HBL-1	65	männlich	Pleuraerguss	48	unspezifisch
OCI-LY 3	52	männlich	Knochenmark	24	bcl2-Amplifikation
OCI-LY 10	66	weiblich	Lymphknoten	keine Angabe	unspezifisch
U2932	29	weiblich	Aszites	48	bcl2-Amplifikation,
					<i>p53</i> Mutation

Activated-B-cell-like- (ABC-) DLBCL (Laboreigene Zellbank; ehemals bezogen von Georg Lenz, Berlin):

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten ABC-DLBCL-Zelllinien

Die Zelllinie HBL-1 wurde 1985 in Japan etabliert als reife B-Zell-Zelllinie aus Aszites einer 63-jährigen Patientin mit primärem DLBCL<sup>64</sup>.

Die Zelllinie U2932 ist eine reife B-Zell-Zelllinie aus Aszites einer 29-jährigen Patientin mit primärem DLBCL, die Verdopplungszeit wird mit 48 Stunden angegeben. Die Patientin litt zuvor bereits an einem Hodgkin-Lymphom<sup>64</sup>.

Die OCI-Zelllinien stammen aus dem **O**ntario **C**ancer Institut. OCI-LY 3 ist eine reife B-Zell-Zelllinie aus Knochenmark eines 52-jährigen Patienten mit primärem DLBCL<sup>64</sup>. OCI-LY 10 wurde 1984 als reife B-Zell-Zelllinie aus Lymphknoten einer 66-jährigen Patientin mit primärem DLBCL etabliert<sup>65</sup>.

## 3.1.2 Therapeutika

Bortezomib, B-1408, 1 mM	LC Laboratiories, USA
Idelalisib, Cal-101, 10 mM	Intellikine Inc, USA
Ibrutinib, PCI-32765, 10 mM	Pharmacyclics Inc, USA
Temsirolimus, 100 mM	Pfizer Inc, USA

# 3.1.3 Media, Lösungen, Verbrauchsmaterial

Media/Seren/Zusätze:

DPBS + Calcium + Magnesium	PAN-Biotech GmbH; 94501 Aidenbach		
Foetal Bovine Serum 0,2 µM sterile filtered;	PAN-Biotech GmbH; 94501 Aidenbach		
Gefrorenes Plasmapherese-Frischplasma (FFP)	Institut für Transfusionsmedizin, Klinikum der Universität München-Großhadern; hergestellt durch Suhl gGmbH 98491 Suhl		
Heparin-Natrium 25000	Ratiopharm GmbH; D-89079 Ulm		
IMDM + L-Glutamin + 25 mM HEPES (2-(4- (2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA		
Penicillin/ Streptomycin 10000 U/ml 10 mg/ml	PAN-Biotech GmbH; 94501 Aidenbach		
RPMI 1640 + L-Glutamin + NaHCO <sub>3</sub>	PAN-Biotech GmbH; 94501 Aidenbach		

# Lösungen/ Reagenzien:

1,5 M Tris Puffer pH 8,8	Apotheke Innenstadt, Klinikum der Universität München,
	Deutschland
10% APS	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO 63178
10% SDS	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO 63178
2-Propanol 70%	Carl Roth GmbH + Co. KG; 76231 Karlsruhe, Deutschland
30% acrylamide mix	Carl Roth GmbH + Co. KG; 76231 Karlsruhe, Deutschland
5% Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG; 76231 Karlsruhe, Deutschland
Actin A-2066	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO 63178
AKT-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 9272
Anti-Rabbit Western Blot Antikörper	Promega Corporation Madison, WI 53711 USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO 63178
BTK-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 3532
Coulter Clenz cleaning agent, coulter isoton	Beckman Coulter GmbH; 47807 Krefeld
ll Diluent	Deutschland
Couramin Acid	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO 63178
Dimethylsulfoxide	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO 63178
Elektrophorese Puffer 10x	Apotheke Innenstadt, Klinikum der Universität München,
Gel-Transfer Puffer	Deutschland
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Glycerol	MP Biomedicals, Solon, OHIO 44139
Luminolsalz	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO 63178
M7001	Cell Signaling Technology, Produktnummer M7001
MEK1/2-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 9122
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO 63178
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG; 76231 Karlsruhe, Deutschland
MNK1-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 2195
mTOR-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 2983
MycoAlert <sup>®</sup> Mycoplasma Detection Kit	Lonza Rockland, Inc. ME 04841 USA
Natriumazid	Carl Roth GmbH + Co. KG; 76231 Karlsruhe, Deutschland
NET 10x pH 7,7	Apotheke Innenstadt, Klinikum der Universität München,
	Deutschland
PDK1-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 3062
peqGOLD Protein Marker V	PEQLAB Biotechnologie GMBH, D-91052 Erlangen
p44/42 MAPK-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 9102
phAKT-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 4058
phMEK1/2-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 9121
phmTOR-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 2971
ph-p44/42 MAPK-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 4377
ph-p90RSK1-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 9344
phPDK1-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 3061
phRaptor-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 2083
phRictor-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 3806
Raptor-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 2280
Rictor-Antikörper	Cell Signaling Technology, Produktnummer 2140
TBS-Puffer 10x pH 8,0	Apotheke Innenstadt, Klinikum der Universität München,
	Deutschland

TEMED	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO 63178
Trypan blue solution 0,4%	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO 63178, USA
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO 63178

### Verbrauchsmaterial:

Latex-Einmalhandschuhe, Peha-soft satin,	PAUL HARTMANN AG, 89522 Heidenheim Deutschland
Powderfree	
Amersham-Hybond <sup>™</sup> Blotting Membrane	GE Healthcare, General Electric Corporation
15 ml Falcon	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, 22926 Ahrensburg
	Germany
2 ml safelock-tubes	Eppendorf AG; 22339 Hamburg
	Deutschland
50 ml Falcon	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
5 ml Polystyrene round bottom tube	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Amersham-Hybond <sup>™</sup> Blotting Membrane	GE Healthcare, General Electric Corporation
BD Pharmigen FITC Annexin V Apoptosis	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Detection Kit I	
GB003 Gel-Blotting Papier	Whatman, GE Healthcare
Polystyrene Tissue culture flask 25 cm <sup>3</sup> ,	SARSTEDT AG & Co; 51582 Nümbrecht
75 cm <sup>3</sup> , 175 cm <sup>3</sup>	Deutschland
Costar stripette 1, 2, 5, 10, 25 ml	Cornig Incorporated (Vitaris, Schweiz)
Serologische Pipetten	
TipOne 0,1–10 μl; 200 ml; 101–1000 μl	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, 22926 Ahrensburg
Spitze	Germany
Stericup & Steritop Sterilfilter 0,22 μm;	Millipore Corporation; Billerica, MA 01821 U.S.A.
0,45 μm	
Amersham-Hybond <sup>™</sup> Blotting Membrane	GE Healthcare, General Electric Corporation
GB003 Gel-Blotting Papier	Whatman, GE Healthcare
Polystyrene Tissue culture flask 25 cm <sup>2</sup> ,	SARSTEDT AG & Co; 51582 Nümbrecht
75 cm², 175 cm²	Deutschland
Stericup & Steritop Sterilfilter 0,22 μm;	Millipore Corporation; Billerica, MA 01821 U.S.A.
0,45 μm	
TipOne 0,1–10 μl; 200 ml; 101–1000 μl	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, 22926 Ahrensburg
Spitze	Germany
Costar stripette 1, 2, 5, 10, 25 ml	Cornig Incorporated (Vitaris, Schweiz)
Serologische Pipetten	

# 3.1.4 Geräte

Accu-jet pro	BRAND GMBH +	- CO KG; 97877	Wertheim - Deut	schland
BD FACSCalibur flow cytometer	BD Biosciences	Palo Alto, CA, U	ISA	
Centrifuge 5415C	Eppendorf Deutschland	AG;	22339	Hamburg
CO <sub>2</sub> -Begasungsinkubator MCO 15AC	SANYO Compor	ient Europe Gm	ıbH (European HC	ג)
Diverse Lichtmikroskope	Leica Microsyst	ems GmbH, 35	578 Wetzlar Geri	many, ehemals
	Leitz, Carl Zeiss	Jena, Deutschla	and	

Feinwaage Kern EMB 200-2	Sartorius Mechatronics Corporation Göttingen, Deutschland			
HERAfreeze HD Ultra Low Temperature	Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA			
Upright Freezers – Discontinued, –80 °C				
HLC Blockthermostat	DITABIS			
	Digital Biomedical Imaging Systems AG, D-75179 Pforzheim,			
	Deutschland			
Inkubations-/Inaktivierungswasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH; D-30938 Burgwedel			
	(Germany			
Mini-PROTEAN	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, CA 94547			
	USA			
Pipetman	Gilson, Inc.; Middleton, WI 53562-0027, USA			
Power PAC 3000	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, CA 94547			
	USA			
Rotanta 46RC	Andreas Hettich GmbH & Co.KG; D-78532 Tuttlingen,			
	Deutschland			
Sicherheitswerkbänke Modelle laminar	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH			
flows 1800, 1200	Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland			
Trans-Blot SD,	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, CA 94547			
Mini-PROTEAN,	USA			
Power PAC 3000				
Vi-CELL™; Vi-CELL™ XR;	Beckman Coulter Fullerton, CA, USA			
4 ml sample vials				
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc, Bohemia, New York 11716			

### 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen müssen in steriler Umgebung durchgeführt werden. Hierzu werden Sterilgutwerkbänke benutzt. Diese erzeugen durch einen Schwebstoff-Partikelfilter einen vertikalen laminaren Luftstrom, wodurch verhindert wird, dass potentiell kontaminierte Luft durch die Arbeitsöffnung in die Werkbank eindringt.

Die Werkbank wird fünf Minuten vor Benutzung eingeschaltet, um den Luftstrom ausreichend aufzubauen. Alle Materialien, die in die Werkbank eingebracht werden, werden vorher mit 70% igem Ethanol flächendesinfiziert. Die Hände werden vor Arbeitsbeginn mit handelsüblichem Händedesinfektionsmittel desinfiziert und anschließend Einmalhandschuhe benutzt. Diese werden regelmäßig und besonders vor dem Hineingreifen in die Werkbank mit Ethanol abgesprüht. Die Zellkulturflaschen und alle benutzten Reagenzien werden ausschließlich in der Werkbank geöffnet. Das Pipettieren wird mit Pipettierhilfen verschiedener Größen und passenden sterilen Einmalaufsätzen durchgeführt. Für größere Mengen steht ein akkubetriebenes Pipettiergerät mit sterilen Einmalpipetten zur Verfügung. Während des Ruhezustands der Sterilgutwerkbank wird eine UV-Lampe kontinuierlich aktiviert, die den gesamten Arbeitsbereich sterilisiert.

### Auftauvorgang:

Alle Zelllinien sind mit  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in Fötalem Kälberserum (FBS) bzw. Humanserum mit Zusatz von 8% Dimethylsulfoxid (DMSO), das die Eiskristall-Bildung verhindert, in 1 ml Cryoröhrchen im -80 °C Gefrierschrank eingefroren. Je ein Röhrchen pro Zelllinie wird im Wasserbad bei 32 °C bis zur Verflüssigung des Materials aufgetaut. Danach werden die Zellen in Falcons mit 10 ml vorgewärmtem Medium pipettiert und bei 1000 rpm zehn Minuten zentrifugiert, um das zytotoxische DMSO zu entfernen. Der Waschvorgang wird ein weiteres Mal durchgeführt. Anschließend werden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen gegeben. Die Zellen werden im  $CO_2$ -Begasungsbrutschrank mit 5%  $CO_2$  bei 36 °C kultiviert, regelmäßig im Lichtmikroskop auf ihre Viabilität untersucht und die Suspension nach Farbumschlag des pH-Indikators im Medium entsprechend durch Mediumzusatz expandiert.

### Zellkultur:

Nach Erreichen eines stabilen Zellwachstums werden die Zellen im Vi-Cell<sup>™</sup> gezählt und auf 0,5x10<sup>6</sup> lebende Zellen/ml durch Entnahme von Zellsuspension und Zugabe frischen Mediums eingestellt.

Während der laufenden Experimente werden alle Zelllinien als Grundstock in 175 cm<sup>3</sup> und in den Versuchsansätzen in 25 cm<sup>3</sup>-Suspensions-Zellkulturflaschen im Brutschrank kultiviert. Für alle GCB-Zelllinien sowie für die ABC-Zelllinien HBL-1 und U2932 wird RPMI 1640 mit Zusatz von L-Glutamin verwendet, wobei 10% FBS zugesetzt wird. Die Zelllinien DB und ULA benötigen einen FBS-Anteil von 20%. Die Zelllinien OCI-LY 3 und OCI-LY 10 benötigen ein Medium mit 20% Volumenanteil humanen Frischplasmas. Diese Zelllinien sind deutlich instabiler im Wachstum und müssen besonders intensiv beobachtet werden. Dreimal pro Woche ist bei allen Zellen der Austausch des Mediums durchzuführen, spätestens jedoch bei Farbumschlag des Indikators. Dafür werden das benötigte frische Medium sowie der Serumzusatz im Wasserbad auf 36 °C vorgewärmt. Währenddessen werden die Zellsuspensionen im Lichtmikroskop auf Kontaminationen mit Bakterien, Pilzen etc. untersucht. Nach gleichmäßiger, vorsichtiger Resuspension wird eine Probe für das automatische Zählgerät genommen. Anschließend wird die Suspension durch berechneten Mediumzusatz wieder auf 0,5x10<sup>6</sup> viable Zellen/ml reduziert und die Zellen werden zurück in den Brutschrank gegeben. Bei schlechtem Zellwachstum und niedriger Viabilität werden die betroffenen Zelllinien nicht für Versuche verwendet und umgehend auf Mycoplasmen getestet. Bei mikroskopisch sichtbarer Kontamination oder positivem Mycoplasmen-Nachweis werden die Zelllinien verworfen und frisches Material aus der Kryokonservierung aufgetaut und für Versuche vorbereitet. Um Verwechslungen zuverlässig auszuschließen, werden vor jedem Versuchsabschnitt Proben für DNA-Tests der hypervariablen mitochondrialen Regionen von den Zelllinien genommen. Zu keinem Zeitpunkt ist eine Vermischung von Zelllinien nachweisbar, was sich auch im konstanten Wachstums- und Versuchsverhalten der einzelnen Zelllinien widerspiegelt. Um genügend Material für größere Versuche zu erhalten, werden die benötigten Zellen zuvor entsprechend expandiert und in größere Kulturflaschen übergeführt, wobei kurzfristig auch Volumina von 300 ml Suspension erreicht werden können. Da die Kontaminationsgefahr in annähernd vollen Flaschen durch die Nähe der Suspension zum Flaschendeckel erhöht ist, wird die Zelllinie nebenbei zur Sicherheit in einer kleinen Flasche weiter kultiviert.

### Einfrieren:

Nach Erhalten neuer Zelllinien oder bei Notwendigkeit, den Vorrat der Linien im –80 °C Gefrierschrank aufzufüllen, müssen Zellen möglichst zeitnah nach dem Auftauen und Vermehren eingefroren werden. Dafür werden die Zellen kultiviert, expandiert und nach Erreichen der benötigten Zellmenge bei gleichzeitig möglichst hoher Viabilität zum Einfrieren vorbereitet. Die Zellen werden mit einer Zellzahl von 1x10<sup>7</sup> Zellen/ml pro Cryoröhrchen eingefroren. Hierfür wird die Zellsuspension im Lichtmikroskop untersucht, im Vi-Cell<sup>™</sup> gezählt und entsprechend auf das Produkt aus Cryoröhrchen-Volumen und Zellzahl eingestellt. Anschließend erfolgt die Abzentrifugation des Kulturmediums in 50 ml Falcons bei

2000 rpm und zehn Minuten Laufzeit. Dabei wird die Zellsuspension bereits auf 4 °C gekühlt. Danach werden die Zellen in der benötigten Menge Einfriermedium gelöst. Das Einfriermedium besteht aus FBS mit 8% Zusatz DMSO (s. o.). Während des Pipettierens der Zellen in die vorbereiteten, beschrifteten Cryoröhrchen werden diese stets auf Eis gelagert.

Medium für die Zelllinien OCI-LY 3 und OCI-LY 10:

Basis des Mediums sind 400 ml IMDM + L-Glutamin + 25 mM HEPES. Wichtigster Zusatz ist humanes Plasmapherese-Frischplasma. Für eine Gesamtmenge von 500 ml Medium werden 100 ml Plasma benötigt. Hierfür wird ein Beutel Plasma mit ca. 220 ml im Wasserbad aufgetaut. Das Plasma wird auf 50 ml Falcons aufgeteilt und bei 2000 rpm zehn Minuten zentrifugiert, um präzipitiertes Protein abzutrennen. 100 ml des Plasmas werden in das Sammelgefäß des Vakuum-Sterilfilters, der Rest zur Wiederverwertung in Falcons gegeben und wieder eingefroren. 400 ml IMDM, 2000 IE Heparin, 0,5 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol (50 mM) und 10 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml bzw. 10 mg/ml) werden dem Sammelgefäß hinzugefügt. Das Gemisch wird zunächst durch einen Filter mit Porengröße 0,45 µm filtriert. Danach wird der Filtrationsvorgang mit Porengröße 0,22 µm wiederholt, um sicherzustellen, dass sich kein ausgefallenes Protein mehr im Medium befindet. Man erhält somit 500 ml klares, gebrauchsfertiges Medium, welches fortan im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt wird.

Fötales Kälberserum (foetal bovine serum, FBS):

FBS wird bei –20 °C im Gefrierschrank gelagert. Zur Verwendung muss das FBS zunächst im Wasserbad aufgetaut werden, um nach Erlangen von Raumtemperatur noch für 45 Minuten bei 56 °C ebenfalls im Wasserbad inaktiviert zu werden. Anschließend ist das FBS gebrauchsfertig und wird im Kühlschrank aufbewahrt. Da FBS ein biologisches Produkt ist, ist die Zusammensetzung inkonstant. Nach Aufbrauchen einer Charge FBS muss deshalb zunächst mit mehreren verschiedenen FBS-Testseren festgestellt werden, welches für die Zelllinien geeignet ist. Es bestehen Unterschiede zwischen den Seren, wobei einige Zelllinien sehr empfindlich darauf reagieren. Daher wird eine drei- bis vierwöchige Beobachtung benötigt, um ein verträgliches und dem Zellwachstum förderliches Serum zu identifizieren. Während eines Versuchsaufbaus wird stets FBS einer Charge verwendet.

### Mycoplasmen-Test:

Der Nachweis einer Mycoplasmen-Kontamination wird mittels eines enzymatischen Tests durchgeführt. Hierzu werden 100 µl Zellsuspension fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand in eine 96-Zellen-Platte pipettiert. Durch Zugabe von 100 µl MycoAlert<sup>®</sup> werden die im Überstand vorhandenen Mycoplasmen lysiert und deren Enzym Luciferase freigesetzt. Nach fünf Minuten Wartezeit wird im Luminometer eine 1 s-Messung der Lichtemission durchgeführt, um einen

Ausgangswert zu erhalten. Anschließend wird MycoAlert<sup>®</sup>-Reagenz zugegeben und das Lysat weitere zehn Minuten inkubiert. Bei Vorhandensein von Mycoplasmen läuft folgende Reaktion ab:

$$ATP + Luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase + Mg^{2+}} Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + Licht$$

Eine zweite Messung im Luminometer erbringt den Positivnachweis, falls die detektierte relative Lichteinheit (relative light unit, RLU) höher ist als der Ausgangswert.

### 3.2.2 Viabilitätszählung mittels Trypanblau-Ausschlusstest

Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der durch Defekte in Zellmembranen in tote Zellen eindringen kann. Zur Ermittlung des Anteils lebender Zellen in einem Versuch werden  $10 \,\mu$ l Zellsuspension mit  $10 \,\mu$ l Trypanblau versetzt, gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben.



Abbildung 3: Schema einer Neubauer-Zählkammer

Dort erscheinen tote Zellen als hell- bis dunkelblau gefärbt und in ihrer Morphologie ungleichmäßig. Im Gegensatz dazu haben intakte, lebende Zellen ein helles Zytoplasma und sind gleichmäßig rund geformt.

Es werden pro Zählung acht der in Abbildung 3 markierten 16-Quadrat-Felder im Lichtmikroskop ausgezählt. Die Berechnung viabler (syn. lebender) Zellen pro Milliliter Suspension erfolgt mit der Formel:

$$n_2 = \frac{n_1 \times 10^4}{4}$$

 $n_1$  ist dabei die Zahl der als lebend beobachteten Zellen in acht Großquadratfeldern, 10<sup>4</sup> der Kammerfaktor und  $n_2$  die Zahl lebender Zellen pro Milliliter. Der Faktor ¼ ergibt sich aus dem Verdünnungsfaktor 2 (Zellsuspension mit Trypanblau 1:1) und dem Quotienten 8 nach Zählung von acht Großquadratfeldern. Die Zählung in der Neubauer-Zählkammer wird als Kontrollinstrument im Vergleich zum automatisierten Gerät (Vi-Cell<sup>TM</sup>) verwendet.

Funktionsweise des Vi-Cell<sup>™</sup>:

Vi-Cell<sup>™</sup> und Vi-Cell<sup>™</sup> XR sind von Beckman Coulter entwickelte automatisierte Messgeräte, die Aussagen zu Zellzahl und Anteil an lebenden Zellen in einer Probe geben. Die Geräte arbeiten ebenfalls mit der Methode des Trypanblau-Ausschluss-Tests.



Abbildung 4: Beispiele der von Vi-Cell<sup>™</sup>-Geräten erstellten Bilder während einer Versuchsauswertung. Das linke Bild zeigt einen Ausschnitt mit zahlreichen viablen Zellen (klares Zytoplasma), das rechte Bild einen Ausschnitt mit einem hohen Anteil toter Zellen (Zytoplasma Trypanblau-positiv, entrundete Zellen).

Für das Vi-Cell<sup>™</sup> sind 1,1 ml Probenmenge, für das Vi-Cell<sup>™</sup> XR 0,5 ml nötig. Die Geräte aspirieren die Proben selbstständig und mischen dazu die benötigte Menge Trypanblau. Die Zellzählung und die Unterscheidung in lebende und tote Zellen erfolgt durch 50 Standbilder, die während des Durchflusses der Zellen durch die Messkammer erstellt werden. In diesen Bildern gemessene Zellen werden vor allem der Farbintensität ihres Zytoplasmas nach beurteilt. Zudem spielen aber Zellgröße, ihre Rundheit und die Dicke und Dichte der Zellmembran eine Rolle bei der Differenzierung zwischen lebend (viabel) und apoptotisch. Die Werte werden von den Geräten gemittelt, angezeigt und abgespeichert. Die absolute Zahl an viablen Zellen, als Maß für die Zellproliferation und der Anteil viabler Zellen an der Gesamtzellzahl einer Probe werden automatisch berechnet. Vor Verwendung neu erhaltener Zelllinien müssen in den Zählgeräten zunächst die Einstellungen für die Beurteilung der Zellen überprüft werden. Alle Zelllinien zeigen brauchbare Messwerte mit der werksseitig mitgelieferten "Default"-Einstellung. Signifikante Unterschiede zwischen dem älteren (Vi-Cell<sup>™</sup>) und dem neueren (Vi-Cell<sup>™</sup> XR) Zählgerät werden nicht beobachtet. Die Geräte führen nach jeder Probe einen ausführlichen Reinigungsvorgang durch, bei dem in der Messkammer verbliebene Zellbestandteile beseitigt werden und die Kammer desinfiziert wird.

Versuchsdurchführung Viabilitätsversuche:

Der erste Arbeitsschritt nach der theoretischen Versuchsplanung ist das Bereitstellen der Therapeutika in den gewünschten Konzentrationen. Dazu muss jeweils eine Verdünnungsreihe mit der Substanz durchgeführt werden. Zum Verdünnen wird DMSO benutzt. Die Verdünnungsreihe für Temsirolimus beispielsweise läuft wie folgt ab: Aus dem 100 mM konzentrierten Grundstock werden 1  $\mu$ l Temsirolimus entnommen und 99  $\mu$ l DMSO hinzugefügt. In einem weiteren Schritt entnimmt man davon wiederum 1  $\mu$ l und gibt dazu 99  $\mu$ l DMSO. Somit erhält man eine Verdünnung um den Faktor 1:10000 und eine Konzentration von 10  $\mu$ M. Nimmt man nun 1  $\mu$ l dieser Lösung pro 1 ml Zellsuspension, ergibt sich ein letzter Verdünnungsschritt 1:1000, was in der Kulturflasche die Endkonzentration 10 nM ergibt.

Die Zelllinien werden vor Ansetzen eines Versuchs mikroskopisch auf Kontamination und Viabilität kontrolliert und anschließend im Vi-Cell<sup>™</sup> gezählt. Gleichzeitig wird Kulturmedium erwärmt und anschließend die Zellzahl in der Vorratsflasche möglichst präzise auf 0,5x10<sup>6</sup> lebende Zellen/ml eingestellt. Versuche werden nur unter der Voraussetzung einer hohen Gesamtviabilität (> 80%) der Zelllinie begonnen. Nach Mediumzugabe wird die Kultur nochmals gemischt, um eine gleichmäßig konzentrierte Suspension zu erhalten. Alle Versuche werden im Dreifachansatz durchgeführt, um bei der Auswertung einen Mittelwert und eine Standardabweichung zu erhalten. Je drei Flaschen werden mit Datum, Name der Zelllinie, zugegebenem Therapeutikum und fortlaufender Nummerierung beschriftet. Zuletzt wird das Therapeutikum in die Pipettierrinne der Flaschen vorgelegt und Zellsuspension zugegeben. Die Flaschen werden geschwenkt, um das Therapeutikum gleichmäßig zu verteilen. Für jeden Versuchsaufbau muss auch eine Kontrolle mit unbehandelten Zellen vorbereitet werden. Auch die Kontrolle wird im Dreifachansatz pipettiert. Um mögliche zellschädigende Effekte der Verdünnungssubstanz DMSO nicht zu vernachlässigen, wird der Kontrolle je 1 µl DMSO pro 1 ml Zellsuspension beigefügt. Um eine artifizielle Vermischung von Zelllinien zu vermeiden, werden die Zelllinien nacheinander pipettiert. Nach Fertigstellung aller Flaschen einer Zelllinie werden diese in den Brutschrank gegeben. Von den drei Kontrollflaschen wird noch eine Probe genommen, die im Vi-Cell™ gezählt wird. Unter Annahme einer zuvor gleichmäßig gemischten Zellsuspension werden der erhaltene Mittelwert und die Standardabweichung später bei der Auswertung auf alle Flaschen dieses Ansatzes als Ausgangs-Zellzahl übertragen. Die hergestellte Verdünnungsreihe der Therapeutika wird bei größeren Restmengen in steriler Umgebung verschlossen und in den -20 °C Gefrierschrank gegeben, um bei einem nächsten Versuch wiederverwendet zu werden. Nach 24, 48 und schließlich 72 Stunden werden die Flaschen aus dem Brutschrank genommen, im Mikroskop begutachtet und zur Probenentnahme in die Sterilgutwerkbank gegeben. Vor dem Pipettieren der Probe werden die Flaschen geschwenkt. Nach erfolgreicher Messung im Vi-Cell<sup>™</sup> werden die Flaschen wieder in den Brutschrank zurückgegeben bzw. nach der 72 h-Messung verworfen. Die Auswertung der Viabilitätsdaten erfolgt in PC-gestützten Kalkulationen. Die absoluten Zellzahlen der Dreifachansätze werden unterteilt nach 24, 48, und 72 Stunden jeweils gemittelt und die Standardabweichungen berechnet. Zusätzlich werden die absoluten Zahlen der Ansätze mit Therapeutika folgendermaßen in Bezug zu den unbehandelten Kontrollen gesetzt:

$$I(A)_t = \frac{\bar{A}_t}{\bar{U}_t}$$

*I* ist die durch Zugabe von Substanz *A* verminderte Zellproliferation zum Zeitpunkt *t* als absolute Zahl, berechnet durch den Quotienten aus dem Mittelwert  $\overline{A}$  der absoluten Zellzahlen in Flaschen mit Substanz *A* und dem Mittelwert  $\overline{U}$  der Zellzahlen in den unbehandelten Kontrollflaschen, gleichzeitig ermittelt zum Zeitpunkt *t*. In den gezeigten Grafiken werden die bei den absoluten Zellzahlen ermittelte Standardabweichung und der berechnete Wert *I(A)*<sup>t</sup> mit 100 multipliziert und anschaulich in Prozent ausgedrückt dargestellt.

Durch die Berechnung der Einzeleffekte der Therapeutika kann man ferner Aussagen zur Wirksamkeit einer Kombination von Substanz A mit Substanz B erhalten. Das Produkt aus  $I(A)_t \times I(B)_t$  ergibt die theoretisch mögliche Proliferations-Inhibition in der Annahme, dass sich Substanz A und Substanz B nicht in ihrem Wirkmechanismus beeinflussen. Durch die Versuche mit Zugabe zweier Therapeutika zum gleichen Zeitpunkt in eine Versuchsflasche erhält man den realen Effekt  $I(AB)_t$ . Grundlage für die Berechnung der Wechselwirkungen ist folgende Formel, der "fractional product"- Methode nach Webb folgend<sup>66</sup>:

$$z = I(A) \times I(B) - I(AB)$$

Um eine Fehlinterpretation nahe dem Ergebnis z = 0 zu vermeiden, werden die Grenzen bei  $\pm$  0,1 festgelegt. Synergismus wird mit z > 0,1, Antagonismus mit z < -0,1 definiert, Ergebnisse zwischen -0,1 und +0,1 gelten als additiver Effekt der Therapeutika.

### 3.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Auswertung verschiedener zellspezifischer Parameter auf der Grundlage ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Diese Methode basiert auf dem Prinzip der Emission von optischen Signalen, die von Zellen generiert werden, während sie einen Laserstrahl passieren. Durch die Analyse des refraktierten Lichtes werden Aussagen über die Größe, innere Zellstruktur (Granularität) sowie Fluoreszenzeigenschaften der Einzelzellen ermöglicht. Zusätzlich zur möglichen Eigenfluoreszenz der Zelle kann eine weitere Fluoreszenz durch die Markierung mit Farbstoffen induziert werden.

Mit Hilfe von Photodetektoren im Durchflusszytometer werden Streulicht und Fluoreszenzlicht erfasst und in elektrische Signale transformiert. Das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) wird von der Zellinnenstruktur beeinflusst, das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) von der Zellgröße. Variable Kanäle verschiedener Emissionsspektren ermöglichen die Erfassung einer Vielzahl von Fluoreszenzfarbstoffen. Durch Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern können so spezifische Strukturen der Zelle, wie zum Beispiel intrazelluläre Proteine, im Durchflusszytometer erkannt und quantitativ erfasst werden.

Spektrale Überlappung bei simultaner, mehrfarbiger Analyse kann zu falsch positiven Artefakten führen und wird durch sogenanntes Kompensieren ausgeglichen. Hierbei wird nach Messung von einfach und doppelt gefärbten Kontrollproben durch elektronische Subtraktion der überlappenden, spektralen Wellenlängen das artifizielle Signal vermindert.

Im Durchflusszytometer FACSCalibur<sup>™</sup> werden die vorbereiteten Zellen angesaugt und mit einer Trägerlösung auf ungefähr 6 m/s beschleunigt. Sie gelangen in eine Messkammer, in der sie von einem luftgekühlten Argonlaser mit 488 nm Wellenlänge angestrahlt werden. Das einfallende Licht wird in den Zellen durch Größe, Zellmembran und Granularität unterschiedlich gestreut. In der Messkammer befinden sich mehrere Detektoren, die das gestreute Licht analysieren. Wichtig ist, dass zur Vermeidung von Artefakten alle Zellen einzeln nacheinander in die Kammer gelangen. Die Geschwindigkeit dafür kann manuell auf 12 µl/min, 35 µl/min und 60 µl/min eingestellt werden und wird vom Anwender anhand der Zahl der Ereignisse pro Sekunde reguliert, welche nicht über 300 betragen soll. Die Anzeige aller Einzelmessungen auf FSC (x-Achse) und SSC (y-Achse) ergibt das Punktwolkendiagramm.

### 3.2.3.1 Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid-Färbung

Die Zellzyklusanalyse wird in dieser Arbeit stets nach 48 Stunden Inkubationszeit der Zelllinien mit den Therapeutika durchgeführt. Für die Analyse müssen die Zellen mit Propidiumiodid versetzt werden, welches in DNA interkaliert. Zellen, die sich im G1- und G0-Stadium des Zellzyklus befinden, haben die einfache Menge DNA und somit auch die einfache Menge Propidiumiodid in der DNA interkaliert. Zellen im G2-Stadium haben kurz vor der Zellteilung die doppelte DNA-Menge und somit die zweifache Menge Propidiumiodid aufgenommen. Zellen in der S-Phase befinden sich statistisch verteilt dazwischen. Die Zellzahlen in G1/G0- und G2-Phase gleichen optimalerweise einer Gauß'schen Normalverteilung. Die Einstellungen für den FSC, SSC und die Propidiumiodid-Detektion auf Detektor FL2 werden vor jedem Versuch mit unbehandelten Zellen neu eingestellt und dann konstant belassen, während eine Versuchsreihe einer Zelllinie gemessen wird. Dazu werden Proben der einzelnen



Abbildung 5: Beispielhaft für alle durchgeführten Zellzyklusanalysen werden je ein Bild einer unbehandelten Probe (links) und einer mit Ibrutinib behandelten Probe (rechts) der Zelllinie HBL-1 nach 48 Stunden Inkubationszeit gezeigt, zusätzlich ist jeweils die numerische Auswertung der Probe dargestellt, wobei der Anteil der Zellen in G1-, S- und G2-Phasen prozentual angegeben ist (Freq. G1, Freq. S, Freq. G2).

Versuchsflaschen im Vi-Cell<sup>™</sup> gemessen, um die Zellzahl und die Viabilität vor der Zellzyklusanalyse zu kennen. Ein Milliliter Zellsuspension pro Flasche wird anschließend entnommen und in die vorbereiteten, beschrifteten 5 ml FACS-Röhrchen gegeben. Zu Beginn muss das Kulturmedium ausgewaschen werden, wofür die Proben mit 2000 rpm zehn Minuten zentrifugiert und die Zellen während des Zentrifugierens bereits gekühlt werden. Anschließend wird der Überstand verworfen, 2 ml kaltes DPBS hinzugegeben und die Zentrifugation wiederholt. Nach Verwerfen des erhaltenen Überstandes werden die Zellen mit 1,5 ml vorgekühltem 70%igem Ethanol versetzt und auf Eis in einer Styroporkiste wärmeisoliert für 30 Minuten inkubiert. Durch die Ethanolfixierung wird erst ermöglicht, dass Propidiumiodid in die Zellen eindringt. Es folgt ein zweifacher Zentrifugations- und Waschgang mit DPBS. Um sicher zu gehen, dass ausschließlich DNA gefärbt wird, werden 50 µl RNAse (100 µg/ml) zugegeben. Als letztes werden den Proben 0,2 ml Propidiumiodid-Lysispuffer-Zubereitung (100 mg Natriumcitrat, 2 mg Propidiumiodid, 100 µl Triton X-100, 100 ml Aqua dest, pH 8,0 mit HCl) beigemengt, wobei Propidiumiodid proportional zur DNA-Menge in diese interkaliert. Die Proben werden innerhalb einer Stunde nach Anfertigung am Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgt mittels der Software FlowJo.

Aus dem Punktwolkendiagramm FSC vs. SSC werden die Zellen ausgewählt, die auf der FSC-Achse ausreichend signalstark sind. Die Zellzahl (y-Achse) wird im Histogramm aufgeteilt nach Propidiumiodidmenge (x-Achse) dargestellt. Um den Auswertungsfehler bei der Berechnung durch FlowJo gering zu halten, werden hier vor der Zellzyklusanalyse nach Watson noch die Bereiche linksseitig der G1- und rechtsseitig der G2-Phase ausgegrenzt. Nach kleinen manuellen Korrekturen werden die kalkulierten G1/G0-, S- und G2-Phasenanteile in Prozent angezeigt.

#### 3.2.3.2 Bestimmung der Apoptoserate mit Annexin V/ Propidiumiodid-Färbung

Für die Apoptosedetektion wird die Kombination aus Propidiumiodid- und Annexin V-Färbung benötigt. Annexin V bindet Ca<sup>2+</sup>-abhängig an den Membranbaustein Phosphatidylserin, welches erst mit Beginn der Zellapoptose von der zytoplasmatischen Seite auf die extrazelluläre Seite der Zellmembran wechselt. Propidiumiodid kann in diesen Versuchen nur durch defekte Zellmembranen apoptotischer Zellen eindringen. Zellen, die positiv für Annexin V und Propidiumiodid gefärbt sind, befinden sich in Spätapoptose oder sind bereits tot. Lebende Zellen sind für keinen der beiden Marker positiv. Zellen, die bereits für Annexin V, jedoch noch nicht für Propidiumiodid positiv gefärbt sind, gelten als frühapoptotisch.



Abbildung 6: Beispiel zweier Apoptosemessungen in der Zelllinie OCI-LY 3 nach 48 Stunden Inkubationszeit: links die unbehandelte Kontrolle, rechts behandelt mit Bortezomib/Idelalisib. Die Zellen werden im Punktwolkendiagramm jeweils in logarithmischer Skalierung dargestellt nach der detektierten Menge gebundenen Annexin V (x-Achse; FL1-H) und der Menge aufgenommenen Propidiumiodids (y-Achse; FL2-H). Durch Einlegen eines Vierquadrantengitters erhält man die prozentuale Verteilung der Zellen in lebende (Q4), früh- (Q3) und spätapoptische Zellen (Q2).

48 Stunden nach Zugabe der Therapeutika wird mit dem Vorbereiten der Proben zur Detektion der apoptotischen Zellen begonnen. Zunächst wird 1 ml Zellsuspension aus den Versuchsflaschen in FACS-Röhrchen pipettiert. Die Zellen werden zweimal bei Raumtemperatur durch Zentrifugation und Zugabe von DPBS gewaschen (s. o.). Es werden je 5 μl Annexin V-FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) und
Propidiumiodid zugegeben. Die Röhrchen werden vorsichtig geschwenkt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach werden 400  $\mu$ l mit Aqua dest 1:9 verdünnter Annexin V Binding Buffer zugegeben. Darin sind enthalten 10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4), 140 mM NaCl und 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>. Ausgewertet werden die Daten mit FlowJo.

#### 3.2.4 Western Blotting

24 Stunden nach Ansatz und der Analyse im Vi-Cell<sup>™</sup> werden den Zellkulturflaschen Proben mit einer Million Zellen für Western Blot- Analysen entnommen. Eine Probe wird jeweils in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und bei 2000 rpm für elf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend abpipettiert. Um in den Zelllinien OCI-LY 3 und OCI-LY 10 Nebenbanden aufgrund des FFP-Zusatzes zu reduzieren, werden diese Zellen nach der ersten Zentrifugation zusätzlich noch einem Waschgang mit DPBS unterzogen. Auf das Zellpellet werden 90 µl Lysispuffer gegeben und die Proben über Nacht in einen rotierenden Ständer gestellt. Am nächsten Morgen können die Proben dann eingefroren oder bereits für Western Blots verwendet werden. Dazu werden als nächstes 10 µl Bromphenolblau zu den lysierten Zellen gegeben. Es folgt ein fünfminütiges Verweilen der Proben im 95 °C Heizblock. Nach kurzem Abkühlen der Proben werden diese noch eine Minute bei 2000 rpm zentrifugiert, um das im Gefäß verdunstete Kondensat wieder der Probe zuzufügen. Abschließend lagert die Probe auf Eis.

#### Acrylamid Gele:

Die Dichte eines Gels setzt sich aus dem Verhältnis Acrylamid/Wasser zusammen und wird in Prozent angegeben. Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese lassen sich Proteinmengen auf Grund ihrer Masse auftrennen. Dabei wandern die zu trennenden Proteine nach Anlegen einer elektrischen Spannung durch eine inerte Matrix aus stark vernetzten Polyacrylamidketten. Zur Optimierung der Auftrennung wird das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) zugefügt, welches die Proteine denaturiert und zu einer Dissoziation der multimeren Proteine in ihre Untereinheiten führt. Weiterhin wird durch die Bindung des stark negativ geladenen SDS an durchschnittlich jede zweite Aminosäure der Polypeptidketten erreicht, dass die ursprüngliche Ladung des Proteins vernachlässigt werden kann; es liegen alle Proteine mit einem angeglichenen Ladung-Masse-Verhältnis vor. Dadurch ist ausschließlich die Länge der Polypeptidkette (entspricht der Proteinmasse) für die Laufgeschwindigkeit entscheidend.

Es werden 8-, 10- und 12%ige Gele verwendet. Bestandteile der Gele sind H<sub>2</sub>O, Acrylamid-Mix 30%, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 1,5 M und SDS 10%. Als letztes werden Ammonium-Persulfat 10% und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) zugegeben und das Gemisch durchmengt. Die freien Radikale des Ammonium-Persulfates sind für die Polymerisation des Gels verantwortlich, wobei diese Reaktion durch TEMED katalysiert wird. Nach Durchmengen wird die Lösung sofort in die vorbereiteten Formen gegossen und ist nach 30 Minuten ausgehärtet. Auf das fertige Gradientengel wird zusätzlich ein Sammelgel mit einem geringeren Anteil Acrylamid-Mix in gleicher Arbeitsweise

32

gegossen, in welches die Kämme mit 20 Fächern eingesetzt werden. Nach weiteren 30 Minuten ist das Sammelgel ausgehärtet und die Kämme können entnommen werden.

Die Kämme werden in die Laufkammer installiert und diese mit Laufpuffer befüllt. In das erste Fach wird der Protein-Standard geladen, der eine Größenbestimmung der Banden ermöglicht. Anschließend werden die Proben der Dreifach-Versuchsansätze nebeneinander in die Fächer pipettiert. Die Spannung während eines Laufes beträgt während der ersten halben Stunde 61 V, dann für eineinhalb Stunden 81 V und schließlich 121 V, bis die gewünschten Proteingrößen optimal auf der Gellänge aufgeteilt sind. Nach dem Lauf werden die Gele auf vorbereitetes Membranpapier in die Blotkammer gelegt. In die Kammer wird Puffer hinzugegeben und das Übertragen gestartet. Das Blotten wird zweieinhalb Stunden durchgeführt, sodass die Proteine fest auf der Membran fixiert sind. Die Membranen werden für eine Stunde in Milch geblockt, wodurch freie Protein-Bindestellen mit Milchbestandteilen besetzt werden. Die 5% ige Milch wird durch Lösen von Milchpulver in TBST-(Tris-Buffered Saline Tween 20) Puffer hergestellt. Nach dem Blocken werden die Membranen dreifach mit TBST-Puffer gewaschen. Es folgt die Zugabe des ersten Antikörpers, wobei diese jeweils in 5% Albumin Fraktion V verdünnt werden. Pro Versuchstag und Membran wird jeweils nur ein erster Antikörper verwendet. Die Membranen werden in Falcons gelegt und zwölf Stunden bei 4 °C auf einem Rollgerät bewegt. Vor Zugabe des zweiten Antikörpers werden die Membranen dreimal gewaschen. Die Membranen werden mit dem zweiten Antikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Weitere drei Waschgänge sind notwendig vor Zugabe der Lumineszenz-Lösung. Diese wird unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 3 ml Lösung A (200 ml 0,1 M Tris-HCL pH 8,6, 50 mg Luminol), 300 µl Lösung B (11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO) und 0,9  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%) hergestellt. Die Membranen werden aus den Falcons genommen und flach auf eine Folie gelegt, auf die 3 ml Lumineszenz-Lösung je Membran pipettiert wird. Nach einer Inkubationszeit von zwei Minuten wird überschüssige Lösung mit Zellstoff aufgenommen und die Membranen werden in Röntgenkassetten in die Dunkelkammer transportiert. Dort werden blausensitive Röntgenfilme zwischen drei Sekunden und fünf Minuten lang durch die Membranen belichtet und sofort entwickelt. Nach einer halben Stunde Waschzeit mit TBST-Puffer können die Membranen mit dem nächsten ersten Antikörper wiederverwendet werden. Bis zu acht verschiedene Antikörper werden auf einer Membran detektiert. Die Auswertung der Röntgenfilme erfolgt durch das Einscannen und Erstellen eines Graustufenabbildes. Mit dem Programm TINA 2.0 kann die Leuchtintensität der manuell umrandeten Banden in der Einheit od/mm<sup>2</sup> ermittelt werden. Nach Herausrechnen der Hintergrundintensität erhält man absolute Zahlen, die dann aus den Dreifachansätzen gemittelt und in Bezug zu den unbehandelten Kontrollen gesetzt werden. Banden mit höherer optischer Dichte als die Kontrollen zeigen eine höhere Expression der Proteine an und umgekehrt.

33

Um den Einfluss der Proteinmenge herausrechnen zu können, wird die Dichte der Antikörperbanden stets im Verhältnis zur Dichte des Aktins der gleichen Probe gemessen.



Abbildung 7: Dargestellt ist exemplarisch für die durchgeführten Western Blots ein Blot der Zelllinie HBL-1 nach 24 Stunden Inkubation mit der Bande phRictor. Die Acrylamidgele erlauben die gleichzeitige Befüllung in 18 Kammern. Von rechts nach links sind zu sehen jeweils die Banden der Triplets der unbehandelten Proben (UTR), sowie nach Inkubation mit Bortezomib, Temsirolimus, Bortezomib/Temsirolimus, Ibrutinib und Bortezomib/Ibrutinib. Die Anwendung von Temsirolimus führt hier sowohl in Monotherapie als auch in Kombination zu einem vollkommenen Verschwinden der phRictor-Bande, was für eine komplette Dephosphorylierung von Rictor spricht.

# 4 Ergebnisse

# 4.1 Viabilitätsversuche zur Dosisfindung mit Monosubstanzen

## 4.1.1 Bortezomib

## 4.1.1.1 ABC-Zelllinien



In den Zelllinien OCI-LY 3 und OCI-LY 10 ergeben sich sehr wechselhafte Ergebnisse in den Dosisfindungsexperimenten. In OCI-LY 3 erreicht man mit 2,5 nM einen mäßigen Effekt, jedoch durch die doppelte Konzentration bereits eine sehr starke Proliferationshemmung. Zur besseren Eingrenzung der Konzentration für Kombinationsexperimente wird ein weiterer Ansatz mit den Konzentrationen 4 nM, 4,25 nM und 4,5 nM versucht (Daten nicht dargestellt). Dabei kann man feststellen, dass 4 nM eine vergleichbar starke Zellteilungshemmung bewirkt wie 5 nM im vorherigen Ansatz (17,88% vs. 23,18%). Auch die Reduktion der Viabilität, die Bortezomib in OCI-LY 3 verursacht, ist vergleichbar. Im 5 nM-Ansatz verringert sich die Viabilität um 30 Prozentpunkte auf 49,83%, im 4 nM-Ansatz um 40 Prozentpunkte auf 57,39%. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die Ausgangsviabilität und damit die Proliferationsbereitschaft der Zellen im 4 nM-Ansatz etwas höher ist als im vorherigen Versuch mit 5 nM. Da jedoch beide Konzentrationen eine zu starke Wirkung zeigen, wird 3,75 nM als Konzentration in den Kombinationsexperimenten für Versuche mit OCI-LY 3 verwendet. Auch für OCI-LY 10 wird eine feinere Abstufung von 2 nM bis 2,5 nM versucht, da 2,5 nM bereits einen starken Effekt ergeben. Es zeigt sich kein relevanter Unterschied der Proliferationshemmung durch die feineren

Konzentrationsunterschiede (Daten nicht dargestellt). Zur Vergleichbarkeit mit anderen Zelllinien werden für die Zelllinie OCI-LY 10 deshalb 2,5 nM Bortezomib in den weiteren Versuchen benutzt.

In den Zelllinien HBL-1 und U2932 ergeben die Experimente zur Dosisfindung mit Bortezomib einen mäßigen Effekt (85,41% und 88,85%) bei 1,67 nM und eine starke Proliferationshemmung bei 4,17 nM (21,62% und 26,12%). In den beiden niedrigen Dosierungen ist die Wirkung zunehmend mit längerer Inkubationszeit (Daten nicht dargestellt) und die Viabilität der Zellen bleibt hoch. In der höchsten Konzentration verringert sich die Gesamtzahl der lebenden Zellen im Vergleich zur 0 h-Messung in beiden Zelllinien und die Viabilität ist an Tag 3 des Versuches bei HBL-1 stark reduziert von 97,60% auf 63,87% Anteil lebender Zellen. In U2932 ist dieser Effekt schwächer ausgeprägt zu beobachten. Interessanterweise ist hier der Anteil lebender Zellen mit 87,49% bereits nach 48 Stunden am niedrigsten.





Alle GCB-Zelllinien zeigen eine gleichgerichtete, dosisabhängige Reduktion der Proliferation unter Bortezomib. Bei WILL-2, SU-DHL 4 und SU-DHL 5 ist der Effekt bereits bei 1,67 nM erkennbar, bei den anderen Zelllinien erst bei 4,17 nM. Nach 72 Stunden ergibt sich mit 4,17 nM im Mittel eine Gesamtzahl lebender Zellen von 36,86% bezogen auf die unbehandelten Kontrollen. Da dies ein zu starker Einzeleffekt ist, wird für die Kombination mit anderen Substanzen 2,5 nM als geeignet betrachtet. In allen Zelllinien sinkt der Anteil lebender Zellen stark ab. Messbar wird die Proliferationsreduktion nach 48 Stunden (Daten nicht dargestellt).

### 4.1.2 Temsirolimus

#### 4.1.2.1 ABC-Zelllinien



Die ABC-Zelllinien HBL-1 und U2932 zeigen sich im Monoversuch mit Temsirolimus dosisabhängig sensitiv für Temsirolimus. Nach 72 Stunden beträgt das Zellwachstum unter Inkubation mit 10 nM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei HBL-1 45,35% und bei U2932 57,40%. Dosiseskalationen jenseits von 10 nM bringen keinen weiteren Inhibitionseffekt, sodass 10 nM als geeignete Dosis für einen Kombinationsversuch betrachtet wird. Das stark verminderte Zellwachstum lässt sich bei beiden Zelllinien bereits nach 24 Stunden erkennen. Die Viabilität der Zellen ist bei allen Dosisstufen uneingeschränkt hoch, was zeigt, dass keine Apoptose der Zellen induziert wird (Daten nicht dargestellt).

In den Zelllinien OCI-LY 3 und OCI-LY 10 bewirkt eine Temsirolimus-Konzentration von 10 nM eine 50% ige Proliferationsinhibition an Tag 3. In OCI-LY 3 ist der Effekt bereits nach 48 Stunden voll ausgeprägt und die Anzahl der lebenden Zellen im 10 nM-Ansatz ist nach 72 Stunden unverändert zum Vortag. Durch eine Dosissteigerung auf 100 nM lässt sich ein etwas stärkerer Effekt erzielen, sodass an Tag 3 44,87% statt 49,05% lebende Zellen gezählt werden im Vergleich zur Zellzahl der unbehandelten Kontrolle. In der Zelllinie OCI-LY 10 ist ein Unterschied zwischen 48 h- und 72 h-Messung in allen Konzentrationen erkennbar. Der Effekt der Wachstumshemmung lässt sich durch die Dosiserhöhung von 10 nM auf 100 nM nicht weiter steigern (47,14% vs. 47,31%). In beiden Zelllinien bleibt die Viabilität auf dem Niveau der unbehandelten Zellen. Insgesamt zeigen sich alle vier Zelllinien des ABC-

Typs sensibel auf 10 nM Temsirolimus mit einer mittleren Proliferationshemmung ( $IC_{50}$ ) von 49,73% nach 72 Stunden Inkubation und einer Breite der Messwerte von 45,35% in HBL-1 und 57,40% in U2932. Daher scheint die Verwendung von 10 nM Temsirolimus sinnvoll für die Kombinationsexperimente.

## 4.1.2.2 GCB-Zelllinien



Alle in den Vorversuchen mit Temsirolimus getesteten GCB-Zelllinien sprechen dosisabhängig auf eine Exposition an. Am empfindlichsten nach 72 Stunden zeigt sich die Linie SU-DHL 5 mit einer Proliferation von 30,04% verglichen zur unbehandelten Kontrolle unter 10 nM Temsirolimus, am wenigsten, jedoch ausreichend empfindlich ist die Zelllinie ULA mit 66,22% Proliferation unter 10 nM. Als geeignete Dosis bei einer mittleren Wachstumshemmung aller GCB-Zelllinien von 51,78% wird die Konzentration 10 nM für sämtliche Kombinationsexperimente verwendet. Durch weitere Dosiseskalation jenseits von 10 nM ist bei sämtlichen Zelllinien keine weitere Inhibition der Zellproliferation messbar.

#### 4.1.3 Ibrutinib

#### 4.1.3.1 ABC-Zelllinien



In der Dosisfindung mit Ibrutinib ergibt sich bei den ABC-Zelllinien ein sehr unterschiedliches Resultat. Die Zelllinie HBL-1 wächst bereits bei einer Dosis von 2,5 nM langsamer und es ergibt sich eine auf 62,11% verringerte Zahl lebender Zellen an Versuchstag 3 verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Der Effekt ist bereits nach 24 Stunden messbar und die Zellen proliferieren in den darauffolgenden 48 Stunden kaum. Interessanterweise bringt eine 400-fache Dosiseskalation auf 1 μM Ibrutinib keinen weiteren messbaren Effekt, wobei auch die Viabilität der Zellen konstant hoch bleibt (Daten nicht dargestellt). U2932 zeigt durch alle Dosisstufen gemittelt im Rahmen der Standardabweichung einen keinen messbaren Effekt (95,60%).

In OCI-LY 10 erhält man einen dosisabhängigen Effekt, mit einer Inhibition von 54,23% nach 72 Stunden durch Inkubation mit 2,5 nM Ibrutinib. Die Viabilität der Zellen sinkt mit zunehmender Dosis von 98% lebenden Zellen in den unbehandelten Kontrollen über 96% (2,5 nM), 92% (5 nM) auf 91% bei einer Dosis von 50 nM. Der Effekt der Proliferationsreduktion zeigt sich zeitabhängig über alle Versuchstage in den beiden niedrigen Konzentrationen, bei 50 nM ist kein Wachstum mehr zwischen 48 und 72 Stunden messbar (Daten nicht dargestellt). OCI-LY 3 zeigt über alle verwendeten Dosierungen konstant eine schwache Hemmung der Zellteilung, wobei bei 2,5 nM ein Wert von 83,20% lebender Zellen verglichen zur unbehandelten Kontrolle berechnet wird. Die Viabilität der Zellen ist dabei unverändert zur Kontrolle. Zusammenfassend erscheint die Verwendung von 2,5 nM sinnvoll, da in zwei Zelllinien der gewünschte Effekt einer ca. 50%igen Proliferationsinhibition erzielt wird (62,11% bei HBL-1; 54,23% bei OCI-LY 10) und bei den wenig empfänglichen Zelllinien U2932 und OCI-LY 3 kein Effekt durch eine Dosiseskalation erzielt werden kann.



## 4.1.3.2 GCB-Zelllinien

In der Dosisfindung mit Ibrutinib lässt sich in allen GCB-Zelllinien außer HT bis zu einer Konzentration von 100nM dosisunabhängig eine mäßige Proliferationsinhibition von etwa 80 bis 85% beobachten. In den Zelllinien ULA, SU-DHL 5 und HT lässt sich durch eine Konzentration von 1  $\mu$ M Ibrutinib eine etwas stärkere Inhibition auslösen, insbesondere bei ULA wird ein Wert von 37,75% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erreicht. Die Effekte unter 2,5 nM sind bereits nach 24 Stunden erkennbar und die Viabilität der Zellen bleibt konstant hoch über alle Dosisstufen hinweg (Daten nicht dargestellt). Da 2,5 nM Ibrutinib ausreichen, um bei einigen GCB-Zelllinien einen Effekt hervorzurufen und die Vergleichbarkeit mit den ABC-Zelllinien erhalten werden soll, wird diese Konzentration in den weiteren Experimenten beibehalten.

### 4.1.4 Idelalisib

#### 4.1.4.1 ABC-Zelllinien



In den Monosubstanzversuchen mit Idelalisib zeigen sich die ABC-Zelllinien HBL-1 und U2932 bereits bei einer äußerst niedrigen Dosierung von 1 nM leicht sensitiv. Bis zur 1000fachen Steigerung der Dosis ist der Effekt konstant, durch die weitere Eskalation auf 10  $\mu$ M Idelalisib erzielt man schließlich eine signifikante Reduktion im Vergleich zu 1  $\mu$ M. Man erhält eine Inhibition auf 60,29% UTR bei HBL-1 und 69,51% UTR bei U2932. Die Zellen teilen sich unter den vier niedrigen Dosierungen etwas vermindert im Vergleich zur Kontrolle, bei 10  $\mu$ M ist keine Proliferation mehr messbar und die absolute Zellzahl ist identisch zur 0 h-Messung (Daten nicht dargestellt). Der zusätzliche Effekt durch 10  $\mu$ M bei HBL-1 zeigt sich auch in der Reduktion der Viabilität, die erst in dieser Konzentration messbar abnimmt. In U2932 erhöht sich der Effekt der relativen Wachstumshemmung mit der Dauer der Inkubation konstant und die Zellen teilen sich auch unter 10  $\mu$ M noch mäßig schnell, wobei die Viabilität der Zellen stets der unbehandelten Kontrolle gleicht.

In OCI-LY 3 ist das Verhalten zwischen 10 nM und 1  $\mu$ M Idelalisib konstant, ähnlich zu den Zelllinien HBL-1 und U2932. In der Zelllinie OCI-LY 10 erreicht man einen stärkeren Effekt durch die Eskalation von 100 nM auf 1  $\mu$ M, einhergehend auch mit einer Verringerung der Viabilität der Zellen. Insgesamt zeigt sich in der Zelllinie OCI-LY 10 ein stärkerer Effekt durch 1 $\mu$ M Idelalisib sowie in HBL-1 und U2932 durch 10 $\mu$ M. In den weiteren Experimenten wird eine Konzentration von 5  $\mu$ M Idelalisib in allen ABC-Zelllinien verwendet, um weiterhin auch einen Vergleich zu den GCB-Zelllinien möglich zu machen.

41

### 4.1.4.2 GCB-Zelllinien



Vier von sechs DLBCL-Zelllinien des GCB-Phänotyps zeigen sich empfindlich für Idelalisib, bei DB und SU-DHL 4 kann auch mit hohen Konzentrationen keine Proliferationsinhibition bewirkt werden. Die Zelllinien HT, SU-DHL 5 und ULA reagieren ab 100 nM Idelalisib dosisabhängig mit reduzierter Proliferation, bei WILL-2 tritt ein stärkerer Effekt erst mit 10  $\mu$ M ein. Bei 10  $\mu$ M ergibt sich bei den sensitiven Zelllinien ein Mittelwert von 54,76%. Dass ULA am sensitivsten für Idelalisib ist, zeigt sich auch in der Verringerung der Viabilität bei 10  $\mu$ M, was bei allen anderen Zelllinien nicht beobachtet werden kann (Daten nicht dargestellt). Unterschiede der Zellzahlen zu den unbehandelten Kontrollen sind bei den empfindlichen Zelllinien nach 48 Stunden messbar. 5  $\mu$ M Idelalisib werden als ausreichend betrachtet, um kombinatorische Wirkungen in weiteren Experimenten beobachten zu können.

# 4.2 Viabilitätsversuche mit Substanzkombinationen

# 4.2.1 Kombination Bortezomib mit Temsirolimus/ Ibrutinib/ Idelalisib

# 4.2.1.1 ABC-Zelllinien

## HBL-1:



abgebildet.

Initial nach 24 Stunden ist die Kombination Bortezomib/Temsirolimus stark synergistisch (0,25). Während in den Monoansätzen die Zellen während der ersten 24 Stunden noch proliferieren, bleibt die Zahl lebender Zellen in der Kombination unverändert zum Ausgangswert. Die Viabilität der Zellen sinkt in der Kombination deutlich ab und erreicht nach 72 Stunden 78,37%. Nach 48 (–0,18) und 72 Stunden (–0,13) ergibt die Kombination ein antagonistisches Ergebnis. Bortezomib mit Ibrutinib zeigt additive Effekte über drei Messtage. Während die Viabilität der Zellen unter Ibrutinib mono unverändert bleibt, liegt diese in der Kombination (67,23%) im Bereich von Bortezomib mono (69,17%), ebenso die absolute Zahl lebender Zellen (0,47x10<sup>6</sup>/ml). Ähnlich verhält sich das Ergebnis

der Kombination Bortezomib/Idelalisib. Nach 24 Stunden noch synergistisch (0,17), ist der Effekt in den beiden weiteren Messtagen additiv. Diese Kombination erreicht nach 72 Stunden 0,43x10<sup>6</sup>/ml lebende Zellen mit einer Viabilität von 65,97%, insgesamt der niedrigste erzielte Wert einer Kombination in HBL-1.



#### U2932:

Abbildung 17: Zellzahlen der mit den Monosubstanzen und ihren verschiedenen Kombinationen versetzten ABC-Zelllinie U2932 nach 72 Stunden Inkubationszeit sowie die Berechnung synergistischer (grün) und antagonistischer (rot) Effekte aller Kombinationen zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden

Die Kombination Bortezomib und Temsirolimus verhält sich zu Beginn der Inkubation bei Betrachtung der Zellzahl überadditiv und im Verlauf additiv, wobei beide Einzelsubstanzen im Bezug auf die absoluten Zellzahlen verglichen zu den unbehandelten Kontrollen bereits gute Ergebnisse erzielen können (Bortezomib mono nach 72 Stunden 43,2%; Temsirolimus mono 61,8%; Kombination 29,3%). Der Anteil lebender Zellen nimmt ebenfalls in der Kombination stark ab (72,8%). Mit Ibrutinib bewirkt Bortezomib in U2932 nach 72 Stunden eine synergistische Reduktion der Zellzahl auf 26,6% verglichen mit der unbehandelten Probe und den Einzelsubstanzen (Ibrutinib 90,9%). Bortez

omib und Idelalisib zeigen bereits nach 24 Stunden und weiter auch im Verlauf der Inkubation einen stark ausgeprägten Antagonismus, der mit 87,8% eine Zahl lebender Zahlen nahe der unbehandelten Kontrolle ergibt, während die Einzelsubstanzen durchaus messbare Effekte erwirken (Idelalisib 71,2%).

## OCI-LY 3:



OCI-LY 3 zeigt unter Bortezomib/Temsirolimus additive Effekte über drei Versuchstage. Die Zellen proliferieren weiterhin schwach und erreichen bei einem Ausgangswert von 0,49x10<sup>6</sup> lebende Zellen/ml nach 72 Stunden 0,91x10<sup>6</sup>/ml. Die Viabilität wird durch die einzelnen Inhibitoren nur schwach beeinflusst und sinkt in der Kombination leicht ab auf 91,77% nach 72 Stunden (UTR: 95,93%). Stark synergistische Effekte werden durch die Kombination von Bortezomib mit Ibrutinib (72 h: 0,48) und mit Idelalisib (72 h: 0,53) erzielt. Ibrutinib und Idelalisib haben im Monoversuch keinen messbaren Effekt auf die Zellinie OCI-LY 3, Bortezomib mit einer Proliferationshemmung auf 79,62% der unbehandelten Zellen einen mäßigen Effekt. Kombiniert erreicht man über alle Versuchstage eine starke Verringerung der Zellzahl verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Die Viabilität sinkt nach 48 Stunden in beiden Kombinationen ab (mit Ibrutinib: 80,85%; mit Idelalisib: 81,07%) und steigt bis zur 72 h-Messung nicht wieder an. Nach 72 Stunden werden mit Ibrutinib 1,06x10<sup>6</sup> lebende Zellen/ml gemessen, mit Idelalisib 1,03x10<sup>6</sup>/ml.

## OCI-LY 10:



Bortezomib ist mit Temsirolimus, Ibrutinib und Idelalisib in der Zelllinie OCI-LY 10 leicht antagonistisch. Alle vier Inhibitoren erzielen bereits einzeln gute Effekte in dieser Zelllinie. Die Zahl der lebenden Zellen ist in allen Kombinationen ca. 0,86x10<sup>6</sup> lebende Zellen/ml (UTR: 1,63x10<sup>6</sup>/ml), was in keinem Monoansatz erreicht wird. Die Viabilität bleibt in allen Ansätzen annähernd unverändert zur unbehandelten Kontrolle.

# 4.2.1.2 GCB-Zelllinien

#### DB:

![](_page_52_Figure_3.jpeg)

In DB ergibt die Kombination Bortezomib mit Temsirolimus einen antagonistischen Effekt. Beide Einzelmedikamente erzielen gute Effekte nach 72 Stunden (Bortezomib 37,25% UTR; Temsirolimus 56,28% UTR), die Kombination 38,57% Zellteilung verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Die Berechnung des kombinatorischen Effekts ergibt mit –0,15 bereits nach 48 Stunden Inkubationszeit deutlich antagonistische Ergebnisse. Passend dazu verhält sich die Viabilität der Zellen, die unter Bortezomib mono nach 72 Stunden auf 83,79% abfällt (UTR: 96,88%) und in der Kombination etwas höher bleibt bei 87,12%. Gemeinsame Inkubationen von Bortezomib mit Ibrutinib sowie von Bortezomib mit Idelalisib zeigen nach 72 Stunden jeweils einen additiven Effekt der Substanzen (Bortezomib/Ibrutinib –0,05; Bortezomib/Idelalisib –0,04). Interessanterweise sind nach 24 Stunden synergistische Effekte (Bortezomib/Ibrutinib 0,13; Bortezomib/Idelalisib 0,15) zu sehen, die sich erst nach 72 Stunden durch den starken Einzeleffekt von Bortezomib relativieren. In beiden Kombinationen nimmt die Viabilität der Zellen ähnlich wie bei Bortezomib mono ab.

![](_page_53_Figure_1.jpeg)

HT:

Bortezomib und Temsirolimus zeigen in HT starke Einzeleffekte, die Kombination ergibt eine Wachstumshemmung auf 28,53% UTR. Die Viabilität der Zellen in dieser Kombination ist nach 72 Stunden um 20 Prozentpunkte geringer als die der Kontrollen. Insgesamt errechnet sich in der Kombination Bortezomib/Temsirolimus mit –0,10 ein tendenziell antagonistischer Effekt. Bortezomib mit Ibrutinib ergibt einen Additivismus über alle Messpunkte. Mit Idelalisib zusammen erreicht Bortezomib nach 24 Stunden einen synergistischen Effekt (0,16), der sich nach 48 und 72 Stunden auf ein additives Maß reduziert. Der initiale synergistische Effekt spiegelt sich auch in der einsetzenden Viabilitätsminderung der Zellen wider, die nach 24 Stunden auf 84,10% absinkt, während unbehandelte Kontrollen und Monosubstanzflaschen bei ca. 90% Anteil lebender Zellen liegen.

## SU-DHL 4:

![](_page_54_Figure_2.jpeg)

In SU-DHL 4 liegt der inhibitorische Effekt der Kombination Bortezomib/Temsirolimus nach 72 Stunden (41,64%) nahe dem Einzeleffekt von Temsirolimus (42,75). Mit –0,11 zeigt die Berechnung einen Antagonismus der beiden Substanzen, da Bortezomib mono selbst auch einen mittelstarken Effekt hat (71,71%). Der Antagonismus entwickelt sich über die drei Versuchstage aus zunächst additiven Ergebnissen (24 h: 0,06; 48 h –0,05). Betrachtet man die Viabilität, zeigt sich in der Kombination eine vermehrte Reduktion der lebenden Zellen in der Kombination (UTR: 95,89; Bortezomib 91,25%; Temsirolimus 89,78%; Bortezomib/Temsirolimus: 87,21%). Die Zellen proliferieren in den Ansätzen mit Temsirolimus mono und kombiniert mit Bortezomib nicht und bleiben auf dem Ausgangsniveau. Bortezomib mit Ibrutinib zeigt nach 24 Stunden synergistische (0,11) und in den weiteren Messungen klar additive Effekte (48 h: 0,04; 72 h: 0,04). In der Kombination beider Substanzen proliferieren die Zellen wenig, die Viabilität beträgt nach 72 Stunden 88,59%. Bortezomib und Idelalisib kombiniert sind additiv (72 h: -0,01). Es wird eine Verringerung der Zahl lebender Zellen verglichen zum Ausgangsniveau erreicht, die Viabilität der Zellen nach 72 Stunden ist mit 81,37% stark erniedrigt.

## SU-DHL 5:

![](_page_55_Figure_2.jpeg)

In der Zelllinie SU-DHL 5 ist die Kombination Bortezomib/Temsirolimus nach 24 Stunden additiv (0,05), in den weiteren Messpunkten stark antagonistisch (72 h: -0,21). Beide Inhibitoren erwirken einen starken Einzeleffekt. Einzeln und in Kombination wird ein Proliferationsstopp jeweils bereits nach 24 Stunden erreicht. In der Kombination verringert sich die Zahl der lebenden Zellen nach 24 Stunden auf 89,29%. Additiv über alle drei Messpunkte ist die Kombination Bortezomib/Ibrutinib. Die Zahl der lebenden Zellen/ml ist nach 72 Stunden unter das Ausgangsniveau reduziert, die Viabilität der Zellen beträgt 90,06%. Bortezomib mit Idelalisib zeigt jeweils einen Antagonismus nach 48 (-0,16) und 72 Stunden (-0,17). Insgesamt erreicht diese Kombination die absolut betrachtet niedrigste Zahl lebender Zellen nach 72 Stunden in SU-DHL 5.

![](_page_56_Figure_1.jpeg)

Temsirolimus und die Kombination Bortezomib/Temsirolimus führen in ULA zu einem irreversiblen Wachstumsstopp nach 24 Stunden. Unter Bortezomib mono proliferieren die Zellen über die ersten beiden Versuchstage, an Tag 3 fällt die Zellzahl stark ab. Die Viabilität der Zellen beträgt hier 64,33%. Es zeigt sich an Tag 3 mit –0,31 ein starker Antagonismus, die Zahl der lebenden Zellen ist im Kombinationsansatz höher als die der Monoansätze. Bortezomib/Ibrutinib ist über die ersten beiden Messtage synergistisch, nach 72 Stunden noch additiv wirksam. Mit einer Viabilität von 67,63% ist ein deutlicher Zelluntergang nach 72 Stunden in der Kombination zu beobachten. Die Kombination Bortezomib/Idelalisib erreicht nach 72 Stunden in ULA bei 0,46x10<sup>6</sup> lebender Zellen/ml und einer Viabilität von 67,80% die niedrigste erreichte Zellzahl in ULA. Insgesamt ist die Kombination nach 24 und 48 Stunden synergistisch, durch die starke Wirkung von Bortezomib mono nach 72 Stunden mit – 0,17 antagonistisch.

### ULA:

## WILL-2:

![](_page_57_Figure_2.jpeg)

Die Kombination Bortezomib/Temsirolimus ist in WILL-2 über alle Messpunkte additiv. Die Zahl lebender Zellen ist in der Kombination nach 72 Stunden mit 0,53x10<sup>6</sup>/ml niedriger als bei Bortezomib (0,59x10<sup>6</sup>/ml) und Temsirolimus (0,93x10<sup>6</sup>/ml) und nimmt über die drei Versuchstage bei einem Ausgangswert von 0,72x10<sup>6</sup>/ml stetig ab. Die Viabilität der kombiniert inhibierten Ansätze liegt zwischen den Werten der beiden Einzelmedikamente. Bortezomib zeigt sowohl mit Ibrutinib als auch mit Idelalisib kombiniert nach 24 Stunden einen leichten Synergismus, dessen Effekt sich nach 48 und 72 Stunden reduziert auf additive Werte. Nach 72 Stunden bleiben bei Bortezomib/Ibrutinib 0,52x10<sup>6</sup> lebende Zellen/ml, bei Bortezomib/Idelalisib 0,5x10<sup>6</sup>/ml, was in WILL-2 den stärksten erreichten antiproliferativen Effekt bedeutet. Die Viabilität der Zellen sinkt bei beiden Kombinationen etwas ab auf Werte, die nahe von Bortezomib mono (91,90%) liegen.

# 4.2.2 Kombination Temsirolimus mit Ibrutinib/ Idelalisib

![](_page_58_Figure_2.jpeg)

![](_page_58_Figure_3.jpeg)

Mit den Kombinationspartnern Ibrutinib und Idelalisib zeigt Temsirolimus in HBL-1 jeweils eine starke Proliferationsinhibition, die bereits nach 24 Stunden erkennbar wird. Die Viabilität der Zellen sinkt mit Idelalisib stärker ab als mit Ibrutinib. Die Effekte sind additiv, Temsirolimus/Idelalisib nach 24 Stunden kurzzeitig synergistisch. U2932 verhält sich ähnlich wie HBL-1, der Effekt hinsichtlich in Bezug auf die Viabilität ist schwächer ausgeprägt. Die Zellen in den kombinierten Ansätzen erholen sich nach 72 Stunden etwas und beginnen zu proliferieren, die Zellzahl steigt über das Ausgangsniveau an. Insgesamt sind die Effekte additiv. In OCI-LY 3 gleichen die Daten der kombinierten Ansätze gänzlich denen aus Temsirolimus mono. Ibrutinib und Idelalisib haben keine Einzeleffekte und können die vorhandene Wirkung von Temsirolimus nicht verstärken. In der Zelllinie OCI-LY 10 sind additive Effekte zu beobachten. In den ersten 24 Stunden proliferieren die Zellen, nach 48 Stunden ist keine weitere Zunahme der Zellzahl zu erkennen. Alle drei Einzelsubstanzen zeigen deutliche Effekte nach 72 Stunden, deren Kombinationen sind rechnerisch jeweils an der Grenze zwischen additivem und antagonistischem Effekt.

## 4.2.2.2 GCB-Zelllinien

![](_page_59_Figure_2.jpeg)

Die GCB-Zelllinien, alle schwach oder nicht sensitiv für Ibrutinib als einzelnes Therapeutikum, zeigen überwiegend additive oder synergistische Effekte in der Kombination mit Temsirolimus. In SU-DHL 5 ergibt sich über alle drei Versuchstage ein Synergismus der Proliferationsinhibition. Betrachtet man die absoluten Zellzahlen, erkennt man einen kompletten Wachstumsstopp in der Kombination, der sich auch nach 72 Stunden anhält. In WILL-2 ist ebenfalls ein synergistischer Wirkmechanismus zu erkennen. Während die Monosubstanzen die Proliferation etwas hemmen, erreicht man in der Kombination nach 72 Stunden eine Halbierung des Zellwachstums verglichen mit den Kontrollen, die Viabilität selbst ist hierbei nicht reduziert. DB und HT gehören zu den Zelllinien, die sich therapieresistent auf Ibrutinib verhalten. Die Kombination von Temsirolimus mit Ibrutinib bringt ähnliche Werte wie unter Temsirolimus mono. SU-DHL 4 zeigt einen additiven Effekt der beiden Therapeutika, die absolute Zellzahl steigt mäßig an über drei Versuchstage, die Viabilität der Zellen ist reduziert gegenüber den Kontrollen. ULA ist nach 72 Stunden deutlich antagonistisch unter Temsirolimus/Ibrutinib. Durch die Kombination Temsirolimus und Idelalisib werden in allen Zelllinien bei bereits gutem Ansprechen auf die Monosubstanzen (Ausnahme: DB ist resistent gegenüber Idelalisib) additive Effekte bis zur Messung nach 48 Stunden erzielt. In den beiden Zelllinien HT und ULA, in welchen bereits durch Temsirolimus und Idelalisib mono jeweils deutliche Effekte erzielt werden, ergibt sich an Tag 3 in der Kombination rechnerisch ein antagonistischer Effekt (HT: –0,13; ULA: –0,15).

# 4.2.3 Kombination Ibrutinib mit Idelalisib

# 4.2.3.1 ABC-Zelllinien

![](_page_61_Figure_3.jpeg)

Die Kombination Ibrutinib und Idelalisib ergibt bei allen auf die Monosubstanzen sensitiven Zelllinien einen additiven Effekt nach 72 Stunden Inkubation. Nach 24 Stunden ist der Effekt in HBL-1 zunächst sogar synergistisch. Die Zellzahl in HBL-1 bleibt in der Kombination fast unverändert zum Ausgangswert des Versuchs. Durchweg additiv über alle Messpunkte zeigt sich die Zelllinie U2932. Ebenfalls additiv, jedoch etwas verzögert und insgesamt weniger sensitiv reagiert OCI-LY 10. Eine Proliferationshemmung wird nach 48 Stunden in der Kombination erkennbar, die Viabilität bleibt unverändert. OCI-LY 3 ist resistent auf die Einzelsubstanzen und die Kombination, Zellzahl und Anteil lebender Zellen gleichen den unbehandelten Kontrollen.

### 4.2.3.2 GCB-Zelllinien

![](_page_62_Figure_2.jpeg)

Abbildung 29: Relatives Wachstum aller mit Ibrutinib und Idelalisib sowie ihrer Kombination versetzten GCB-Zelllinien nach 72 Stunden Inkubationszeit sowie die Berechnung synergistischer (grün) und antagonistischer (rot) Effekte der Kombination zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden

Die GCB-Zelllinien reagieren durchweg sensitiv auf die Kombination Ibrutinib/Idelalisib. Rechnerisch zeigen sich additive und synergistische Effekte. Kontinuierlich synergistisch über alle drei Versuchstage verhalten sich die Zelllinien DB und SU-DHL5. In letzterer wird der Effekt bereits nach 24 Stunden sichtbar. Die Zellzahl sinkt gegenüber dem Versuchsbeginn etwas ab und bleibt bis 72 Stunden danach unter dem Ausgangsniveau. Die gemessene Viabilität fällt ab auf unter 80% Anteil lebender Zellen, während bei den unbehandelten Kontrollen 94% gemessen werden. Die effektive Wirkung bei DB fällt deutlich schwächer aus, da die Einzelsubstanzen keine Wirkung zeigen. In HT wird der Effekt ab der 24 h-Messung bereits sichtbar und verdeutlicht sich über die beiden folgenden Versuchstage weiter. Die Viabilität in HT bleibt gleich zu den unbehandelten Kontrollen. SU-DHL 4 verhält sich ähnlich wie HT und zeigt in der Kombination nach 24 und 72 Stunden jeweils einen synergistischen Effekt der Kombination. In der Zelllinie ULA erreicht man durch die Kombination einen annähernd kompletten Proliferationsstopp, die Zellzahl nach 72 Stunden ist unverändert zum 0 h-Wert, die Viabilität nimmt etwas ab. WILL-2 zeigt im zeitlichen Verlauf an zwei Messpunkten additive und zuletzt einen leicht synergistischen Effekt.

# 4.3 Ergebnisse Durchflusszytometrie

# 4.3.1 Zellzyklusanalyse

# 4.3.1.1 ABC-Zelllinien

Stellvertretend für die Zellzyklusanalyse in ABC-Zelllinien wurde die Zelllinie HBL-1 verwendet.

HBL-1:

![](_page_63_Figure_6.jpeg)

In der ABC-Zelllinie HBL-1 befinden sich in den unbehandelten Proben im Mittel 42,9% der Zellen in der G1/G0-Phase, 35,7% in der S-Phase und 21,4% in der G2-Phase. In den mit Bortezomib behandelten Proben zeigt sich nach 48 Stunden Inkubation keine Veränderung dieser Verteilung. Temsirolimus bewirkt eine Umverteilung Richtung G1/G0-Phase (50,9%), der Anteil der beiden anderen Phasen geht gleichermaßen zurück um jeweils ca. vier Prozentpunkte. Durch Ibrutinib lässt sich in HBL-1 ein deutlicher G1/G0-Block erzielen (63,6%), wobei ausschließlich die S-Phase kleiner ausfällt. Die S-Phase wird auch durch Idelalisib kleiner und es zeigten sich vermehrt Zellen in der G1/G0-Phase (49,2%). In den Proben der Kombination Bortezomib und Temsirolimus fällt der G1/G0-Block deutlicher aus als beim Mono-Ansatz mit Temsirolimus (58,8% vs. 50,9%). Gleiches gilt für die Kombination Bortezomib/Idelalisib (56,0% vs. 49,2%). Bortezomib und Ibrutinib ergeben keine Veränderung der G1/G0-Phase verglichen mit Ibrutinib mono, es findet hierbei eine Umverteilung der Zellen von G2 in die S-Phase statt. Die Kombination der Therapeutika, die bereits als Monosubstanz einen G1/G0-Block hervorrufen, erzeugt jeweils einen stark ausgeprägten G1/G0-Arrest der Zellen mit 74,3% bei Temsirolimus/Ibrutinib, 69,4% bei Temsirolimus/Idelalisib und 69,8% durch Ibrutinib/Idelalisib. Es werden in diesen Versuchsansätzen kaum Zellen in der S-Phase detektiert.

## 4.3.1.2 GCB-Zelllinien

Stellvertretend für die Zellzyklusanalyse in GCB-Zelllinien wurde die Zelllinie ULA verwendet.

![](_page_64_Figure_3.jpeg)

ULA:

Die GCB-Zelllinie ULA hat im unbehandelten Zustand etwa die Hälfte der Zellen in der S-Phase, sowie 34,6% in G1/G0-Phase und 14,8% in G2-Phase. Durch Bortezomib erreicht man eine Verschiebung aus der S-Phase sowohl zu G1/G0 (44,1%) als auch zu G2 (18,7%). Temsirolimus bewirkt einen sehr starken G1/G0-Arrest (77,7%) der Zellen, ca. 10% verbleiben dabei jeweils in S- und G2-Phase. In den Proben mit Ibrutinib erhält man ähnliche Ergebnisse wie bei Bortezomib (G1/G0: 43,5%). Idelalisib lässt den G1/G0-Anteil auf 61,5% ansteigen, vor allem durch Halbierung des S-Phasen-Anteils auf 27,4% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Kombiniert ergeben Bortezomib und Temsirolimus einen schwächeren G1/G0-Arrest, als dies bei Temsirolimus mono geschieht. In der Kombination Bortezomib/Ibrutinib ist der G1/G0-Wert dem der Monosubstanzen ähnlich, der G2-Anteil sinkt und mehr Zellen befinden sich in der S-Phase. Mit Idelalisib zusammen erzeugt Bortezomib einen G1/G0-Block (56,0%), wobei sich kaum Zellen in der G2-Phase befinden. Temsirolimus ergibt mit den Kombinationspartnern Ibrutinib und Idelalisib jeweils zu Temsirolimus mono ähnliche Ergebnisse. Ibrutinib zusammen mit Idelalisib verursacht einen G1/G0-Arrest (65,1%).

# 4.3.2 Apoptosemessung

Stellvertretend für die Apoptosemessungen in DLBCL-Zelllinien wurde die Zelllinie OCI-LY 3 verwendet.

0	CI	-L	Y	3:	
-	•••			•••	

Mittelwert [%]			
Standardabweichung [%]	lebende Zellen	frühapoptotische Zellen	spätapoptotische/tote Zellen
UTR	87,70	0,66	6,44
	1,87	0,15	1,42
Bortezomib	47,25	2,68	43,60
	20,01	0,08	19,23
Temsirolimus	76,30	3,24	15,73
	1,35	0,07	0,42
Ibrutinib	84,93	2,71	7,28
	0,59	0,04	0,81
Idelalisib	83,23	2,68	6,78
	0,51	0,08	0,42
Bortezomib/Temsirolimus	55,33	5,30	33,00
	2,30	0,36	1,54
Bortezomib/Ibrutinib	42,33	3,44	47,33
	4,41	0,65	5,97
Bortezomib/Idelalisib	33,10	4,20	56,30
	5,94	0,04	5,37

Tabelle 3: Überblick über die prozentuale Verteilung der Zellen in lebende, früh- und spätapoptotische Zellen der Zelllinie OCI-LY 3 nach 48 Stunden Inkubation mit den angegebenen Therapeutika und durchgeführter Apoptosemessungen in der Durchflusszytometrie

In den unbehandelten Zellen sind in der Zelllinie OCI-LY 3 nach 48 Stunden 87,7% lebende Zellen messbar, 0,66% frühapoptotische und 6,44% tote Zellen. Unter Behandlung mit Bortezomib sinkt der Anteil lebender Zellen auf 47,25% ab und der Wert der als tot gemessenen Zellen steigt deutlich auf 43,6%. Durch Temsirolimus ist dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt, wobei ca. 10% der Zellen sich von lebend zu spätapoptotisch verschieben verglichen mit den unbehandelten Kontrollen. Äußerst schwache proapoptotische Effekte bewirken Ibrutinib (84,93% lebende Zellen; 7,28% tote Zellen) und Idelalisib (83,23; 6,78%). Die Kombination von Bortezomib mit Temsirolimus bewirkt eine Reduktion der lebenden Zellen auf 55,33%, die Fraktion der spätapoptotischen steigt auf 33,00%. Bortezomib mit Ibrutinib löst eine starke Apoptoseinduktion aus – 42,33% der Zellen sind lebend, 47,33% tot. Am stärksten ist dieser Effekt in der Kombination Bortezomib/Idelalisib zu beobachten, in welcher nach 48 Stunden noch 33,1% lebende Zellen gemessen werden, 56,30% der Zellen spätapoptotisch oder bereits tot sind.

# 4.4 Ergebnisse Western Blotting

# 4.4.1 ABC-Zelllinien

#### HBL-1:

Die Zelllinie HBL-1 zeigt unter Bortezomib eine Expressionssteigerungen von Rictor, Raptor und BTK. ph-MEK und ph-p90RSK1 werden vermindert exprimiert. Temsirolimus bewirkt eine Zunahme von ph-MEK, p70S6K sowie BTK, ph-PDK wird ebenfalls etwas erhöht gemessen verglichen zur Kontrolle. Nicht mehr messbar ist ph-Rictor; ph-mTOR ist deutlich weniger stark exprimiert. Die Kombination Bortezomib und Temsirolimus hat auf ph-Rictor und ph-mTOR sowie auf BTK eine gleichgerichtete Wirkung wie Temsirolimus mono. Zusätzlich sind ph-PDK und php90RSK1 vermindert exprimiert. Ibrutinib führt zu gesteigerter Expression von ph-MEK1/2, p70S6K und vor allem von BTK. Rictor, ph-AKT und ph-p90RSK1 sind vermindert exprimiert. Ibrutinib kombiniert mit Bortezomib ergibt verglichen mit Ibrutinib mono die getesteten Kinasen.

B + Ibrutinib 3 B + Ibrutinib 2 B + Ibrutinib 1 Ibrutinib 3 Ibrutinib 2 B - Tarriciotimus 3	B     Tensinoninus 2       B     Tensirolimus 1       Fensirolimus 3     Fensirolimus 2       Temsirolimus 1     Fensirolimus 1	Borlezomib (B) 3 Borlezomib (B) 2 Borlezomib (B) 1 UTR 3 UTR 2 UTR 1	임 Akti n MAPK MEK1/2 PDK
			Akti n mTOR phAKT phRictor Raptor phmTOR phRaptor AKT Rictor
			Akti n BTK MNK p70S6K php90RSK1
			Aktin phMEK1/2 phPDK

Abbildung 32: Gezeigt sind alle Originalbilder der an der Zelllinie HBL-1 erfolgreich durchgeführten Proteinexpressionsanalysen. Die Therapeutika und ihre Kombinationen sind in Dreifachansätzen getestet und ausgewertet worden. Unter dem dazugehörigen Aktin befinden sich alle Blots der auf dem jeweiligen Gel getesteten Kinasen.

gleichen Effekte bei ph-AKT, ph-MEK1/2 und BTK. Zusätzlich ist die Expression von AKT deutlich verringert, von ph-Raptor und MEK gesteigert. p70S6K wird im Gegensatz zu Ibrutinib mono in der Kombination weniger exprimiert. Bei ph-p90RSK1 unter Ibrutinib und Bortezomib mono verringert sich kombiniert die Expression weiter verglichen zum Effekt der Monotherapie.

HBL-1	Bortezomib	Temsirolimus	Borte./Temsi.	Ibrutinib	Borte./Ibrut.
AKT	1	1	1	1	-
phAKT	1	1	1	-	-
Rictor	++	1	1	(-)	1
phRictor	1	-	-	1	1
mTOR	1	1	1	1	1
phmTOR	1	-	-	1	1
PDK	1	1	1	1	1
phPDK	1	(+)	(-)	1	1
Raptor	+	1	1	1	1
phRaptor	1	1	1	1	(+)
MEK1/2	1	1	1	1	+
phMEK	-	+	1	+	+
MNK	1	1	1	1	1
MAPK	1	1	1	1	1
p70S6K	1	+	1	(+)	-
втк	+	+	++	++	++
php90RSK1	(-)	1	_	(-)	

Tabelle 4: Die Tabelle zeigt zur besseren Veranschaulichung die Ergebnisse der digital-gestützten Lumineszenzauswertung der jeweiligen Blots diverser Kinasen in der Zelllinie HBL-1. Eindeutige Expressionszunahmen sind mit "+" bzw. "++" gekennzeichnet, Expressionsabnahmen oder Expressionsverluste mit negativem Vorzeichen. Eine gleichbleibende Expressionsstärke wird mit "1" angegeben, schwache Expressionsänderungen sind mit Klammern versehen.

#### U2932:

In der Zelllinie U2932 ist nach Inkubation mit Bortezomib eine leicht verminderte Expression bei AKT und eine stark reduzierte Expression von ph-p90RSK1 zu beobachten. Vermehrt exprimiert zeigt sich ph-MEK, sowie in geringerem Ausmaß auch ph-PDK. Unter Temsirolimus sind AKT, ph-Rictor und MNK geringer exprimiert, ph-AKT ist praktisch nicht mehr nachweisbar. Eine leichte Abnahme ist auch bei ph-PDK und ph-Raptor zu sehen. Die Kombination aus Bortezomib und Temsirolimus ergibt in AKT, ph-AKT, ph-Rictor und ph-PDK das gleiche Bild wie unter Temsirolimus mono. Zusätzlich sind Raptor geringer und ph-MEK, ph-MAPK und p70S6K vermehrt nachzuweisen. MNK ist leicht vermindert exprimiert. Die Monotherapie mit Ibrutinib zeigt eine starke Abnahme bei ph-mTOR, MNK, p70S6K, und ph-p90RSK1. AKT und ph-MAPK sind ebenfalls schwächer exprimiert, eine vermehrte Expression zeigt nur MAPK. Die Kombination aus Bortezomib und Ibrutinib zeigt schwache Zunahmen bei AKT, ph-Rictor, ph-PDK, MAPK und eine stärkere bei BTK. Schwächer exprimiert sind hier Raptor, ph-Raptor, ph-MAPK und ph-p90RSK1.

![](_page_67_Figure_3.jpeg)

Abbildung 33: Gezeigt sind alle Originalbilder der an der Zelllinie U2932 erfolgreich durchgeführten Proteinexpressionsanalysen. Die Therapeutika und ihre Kombinationen sind in Dreifachansätzen getestet und ausgewertet worden. Unter dem dazugehörigen Aktin befinden sich alle Blots der auf dem jeweiligen Gel getesteten Kinasen.

U2932	Bortezomib	Temsirolimus	Borte./Temsi.	Ibrutinib	Borte./Ibrut.
AKT	(-)	-	-	(-)	(+)
phAKT	1			1	1
Rictor	1	1	1	1	1
phRictor	1	-	-	1	(+)
mTOR	1	1	1	1	1
phmTOR	1	1	1	-	1
PDK	1	1	1	1	1
phPDK	(+)	(-)	(-)	1	(+)
Raptor	1	1	-	1	(-)
phRaptor	1	(-)	1	1	(-)
MEK1/2	1	1	1	1	1
phMEK1/2	+	1	(+)	1	1
MNK	1	-	(-)		1
MAPK	1	1	1	+	(+)
phMAPK	1	1	+	(-)	(-)
p70S6K	1	1	+	-	1
втк	1	1	1	1	+
p90RSK1	1	1	1	1	1
php90RSK1		1	1	-	(-)

Tabelle 5: Die Tabelle zeigt zur besseren Veranschaulichung die Ergebnisse der digital-gestützten Lumineszenzauswertung der jeweiligen Blots diverser Kinasen in der Zelllinie U2932. Eindeutige Expressionszunahmen sind mit "+" bzw. "++" gekennzeichnet, Expressionsabnahmen oder Expressionsverluste mit negativem Vorzeichen. Eine gleichbleibende Expressionsstärke wird mit "1" angegeben, schwache Expressionsänderungen sind mit Klammern versehen.

# 4.4.2 GCB-Zelllinien

#### ULA:

Zelllinie Die ULA exprimiert unter Bortezomib mono verstärkt Rictor, ph-mTOR, PDK, Raptor, ph-Raptor, MNK, BTK und leichter ausgeprägt auch MAPK. Temsirolimus mono zeigt bei PDK und MAPK eine Expressionszunahme, bei ph-Rictor, ph-PDK und MNK eine deutliche Abnahme. Kombiniert mit Bortezomib bleibt die Abnahme bei ph-Rictor und MNK bestehen, bei ph-PDK wird der Effekt von Temsirolimus mono aufgehoben und die Kinase etwas verstärkt exprimiert. Zudem werden in der Kombination Bortezomib/Temsirolimus verstärkt folgende Kinasen exprimiert: AKT, Rictor, PDK, MAPK und p70S6K. Ibrutinib bewirkt bei ph-AKT und MNK eine Expressionsabnahme, bei Rictor, dezent

B + Ibrutinib 3 B + Ibrutinib 2 B + Ibrutinib 1 Ibrutinib 1 B + Temsirolimus 3 B + Temsirolimus 2 B + Temsirolimus 1 Temsirolimus 1 Temsirolimus 1 B B + Temsirolimus 1 B B + Temsirolimus 1 B B + Temsirolimus 1 B + Temsirol	Aktin phAKT phmTOR Raptor phPDK
	Aktin AKT Rictor mTOR phRaptor
	BTK MNK Aktin MEK1/2 p70S6K PDK phRictor MAPK

Abbildung 34: Gezeigt sind alle Originalbilder der an der Zelllinie ULA erfolgreich durchgeführten Proteinexpressionsanalysen. Die Therapeutika und ihre Kombinationen sind in Dreifachansätzen getestet und ausgewertet worden. Unter dem dazugehörigen Aktin befinden sich alle Blots der auf dem jeweiligen Gel getesteten Kinasen.

auch bei ph-Rictor, ph-mTOR, Raptor, MAPK und p70S6K eine Zunahme. Unter Bortezomib/Ibrutinib zeigt sich eine verringerte Expression bei ph-AKT. Eine gesteigerte Expression ist messbar bei Rictor, ph-mTOR, Raptor und ph-Raptor, dezenter bei PDK, MAPK und p70S6K.

ULA	Bortezomib	Temsirolimus	Borte./Temsi.	Ibrutinib	Borte./Ibrut.
AKT	1	1	+	1	1
phAKT	1	1	1	_	_
Rictor	+	1	+	++	++
phRictor	1	-	-	(+)	1
mTOR	1	1	1	1	1
phmTOR	+	1	1	++	++
PDK	+	+	+	1	(+)
phPDK	1	-	+	1	1
Raptor	+	1	1	+	+
phRaptor	+	1	1	1	+
MEK1/2	1	1	1	1	1
MNK	+		-		1
MAPK	(+)	+ +	+	+	(+)

Tabelle 6: Gezeigt zur besseren Veranschaulichung sind die Ergebnisse der digital-gestützten Lumineszenzauswertung der jeweiligen Blots diverser Kinasen in der Zelllinie ULA. Eindeutige Expressionszunahmen sind mit "+" bzw. "++" gekennzeichnet, Expressionsabnahmen oder Expressionsverluste mit negativem Vorzeichen. Eine gleichbleibende Expressionsstärke wird mit "1" angegeben, schwache Expressionsänderungen sind mit Klammern versehen.

#### HT:

In der Zelllinie HT führt Bortezomib mono zu einer verstärkten Expression von p90RSK1. Temsirolimus mono zu einer verminderten Expression von ph-Rictor, ph-Raptor und weniger deutlich auch von MEK1/2. Die Expression von BTK und ph-PDK verstärkt sich unter Temsirolimus etwas. Kombiniert man Bortezomib und Temsirolimus, so sind die inhibitorischen Effekte von Temsirolimus bei ph-Raptor annähernd, bei ph-Rictor und MEK1/2 deutlich aufgehoben. ph-PDK wird in der Kombination stärker messbar, ebenso wie BTK und p90RSK1. Ibrutinib lässt als Monosubstanz die Banden von ph-Rictor und ph-AKT komplett ausfallen, ph-mTOR ist deutlich verringert exprimiert zu sehen. Kombiniert mit Bortezomib erscheinen die ph-AKT- und ph-mTOR-Banden wieder, bei ph-Rictor ist eine Expressionszunahme zu beobachten.

B + Ibrutinib 3 B + Ibrutinib 2 B + Ibrutinib 1 B + Ibrutinib 1 B + Ibrutinib 2 Ibrutinib 2 B + Temsirolimus 3 B + Temsirolimus 3 Temsirolimus 1 Temsirolimus 1 B ortezomib (B) 1 UTR 3 B ortezomib (B) 1 UTR 2 UTR 2	
	Aktin
F. · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	MNK
	mTOR
	phRaptor
	p90KSK1
	Aktin
	Rictor
N NO	p70S6K
**************************************	MEK1/2
	phmTOR
	Aktin
	ВТК
	phAKT
	Aktin
	phMAPK
	Aktin
	phPDK
	Aktin
	phMEK1/2

<ul> <li>B + Ibrutinib 3</li> <li>B + Ibrutinib 2</li> <li>B + Ibrutinib 1</li> <li>Ibrutinib 3</li> <li>Ibrutinib 3</li> <li>Ibrutinib 1</li> <li>B + Temsirolimus 3</li> <li>B + Temsirolimus 2</li> <li>B + Temsirolimus 1</li> <li>B + Temsirolimus 1<th>НТ</th><th></th></li></ul>	НТ	
		Aktin
25655555555555555		MAPK
		AKT
		phRictor
* ***********************		Raptor

Abbildung 35: Gezeigt sind alle Originalbilder der an der Zelllinie HT erfolgreich durchgeführten Proteinexpressionsanalysen. Die Therapeutika und ihre Kombinationen sind in Dreifachansätzen getestet und ausgewertet worden. Unter dem dazugehörigen Aktin befinden sich alle Blots der auf dem jeweiligen Gel getesteten Kinasen. Im rechts dargestellten Gel kam es zu einem Ausfall der Bande "Temsirolimus 3".

HT	Bortezomib	Temsirolimus	Borte./Temsi.	Ibrutinib	Borte./Ibrut.
AKT	1	1	1	1	1
phAKT	1	1	1	-	1
Rictor	1	1	1	1	1
phRictor	1	-	1	-	+
mTOR	1	1	1	1	1
phmTOR	1	1	1	-	1
phPDK	1	+	+	1	1
Raptor	1	1	1	1	1
phRaptor	1	-	1	1	1
MEK1/2	1	-	1	1	1
phMEK	1	1	1	1	1
MNK	1	1	1	1	+
MAPK	1	1	1	1	1
phMAPK	1	1	1	1	1
p70S6K	1	1	1	1	(+)
BTK	1	+	+	1	(+)
p90RSK1	+	+	+	1	1

Tabelle 7: Die Tabelle zeigt zur besseren Veranschaulichung die Ergebnisse der digital-gestützten Lumineszenzauswertung der jeweiligen Blots diverser Kinasen in der Zelllinie HT. Eindeutige Expressionszunahmen sind mit "+" bzw. "++" gekennzeichnet, Expressionsabnahmen oder Expressionsverluste mit negativem Vorzeichen. Eine gleichbleibende Expressionsstärke wird mit "1" angegeben, schwache Expressionsänderungen sind mit Klammern versehen.

# 5 Diskussion

Aufgrund des Umfangs der Experimente und zur besseren Übersichtlichkeit werden die Ergebnisse aufgeschlüsselt nach Monosubstanzen bzw. Kombinationen einzeln bewertet und in Ihrer Bedeutung und dem Bezug zu aktuellen Veröffentlichungen eingeordnet.

### 5.1 Bortezomib

Die Dosisfindung bei Bortezomib gestaltete sich hinsichtlich einer für alle ABC-Zelllinien einheitlichen IC<sub>50</sub>-Dosis schwierig. Ein Grund hierfür war das nicht konsistente Ansprechen der Zelllinie OCI-LY 3 auf die Inkubation mit Bortezomib. Dies lässt sich durch eine hohe Sensitivität der Zelllinie gegenüber Anzuchtbedingungen wie z. B. der Mediumzusammensetzung erklären.

Auch die Zelllinie OCI-LY 10 zeigte in feiner abgestuften Dosisfindungsexperimenten beinahe einen On-Off-Effekt. Die beiden weiteren verwendeten ABC-Zelllinien HBL-1 und U2932 zeigten eine dosisabhängige Verringerung ihrer Proliferation. Auch die GCB-Zelllinien reagierten dosisabhängig wenig bei 1,67 nM und sehr stark bei einer Inkubation mit 4,17 nM. Ebenso kam es in beiden Subtypen eine teils ausgeprägte Reduktion der Zellviabilität. Der Unterschied in der Gesamtzahl lebender Zellen nach Inkubation entstand weniger aus einer Proliferationshemmung als vielmehr durch Apoptoseinduktion. Insgesamt Vergleichbarkeit wurde zur besseren in den Kombinationsexperimenten die Verwendung von 2,5 nM Bortezomib für neun von zehn Zelllinien als geeignet angesehen. Wie in der Dosisfindung beschrieben, musste für die Zelllinie OCI-LY 3 eine Dosis von 3,75 nM verwendet werden. In einer Arbeitsgruppe wurde später für ähnliche Kombinationsexperimente eine Dosierung zwischen 2,5 nM und 8 nM für verschiedene DLBCL-Zelllinien verwendet, diese erbrachten ähnliche Ergebnisse<sup>67</sup>. In Versuchen mit Zelllinien anderer Lymphom-Untergruppen wurde für in vitro-Analysen eine Konzentration von 6 nM verwendet<sup>68</sup>.

Wie bereits oben erwähnt, zeigte sich nach Inkubation mit Bortezomib eine teils deutlich reduzierte Viabilität in den Zellkulturansätzen. Dies konnten wir durch Apoptose- und Zellzyklus-Analysen in ausgewählten Zelllinien ebenfalls nachweisen. In OCI-LY 3 waren zahlreiche spätapoptotische Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit zu beobachten, während sich im Zellzyklus in HBL-1 keine bzw. in ULA nur eine mäßige Verschiebung im Sinne eines G0/G1-Arrestes nachweisen ließ. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie decken sich weitgehend mit Publikationen anderer Arbeitsgruppen, es wurde mehrfach über die Hemmung des NF-κB-Signalwegs und eine Apoptoseinduktion über verschiedene Signalwege nach Inkubation von diversen Lymphom-Zelllinien mit Bortezomib berichtet<sup>54, 67</sup>. Die Kausalität zwischen Inaktivierung des NF-κB-Signalwegs und Zellzahlreduktion konnte durch eine selektive Blockade des NF-κB-Signalweges in vitro in ABC- und GCB-Zelllinien bewiesen werden. Hier

66
zeigten die Zelllinien OCI-LY 3 und OCI-LY 10 sowohl erhöhte Apoptoseraten als auch einen partiellen G1-Zellzyklusarrest<sup>69</sup>. Insgesamt wurde durch o. g. Arbeitsgruppen nach Inkubation mit Bortezomib ein deutliches Ansprechen der ABC-Subtypen sowie kein bzw. ein schwaches Ansprechen der GCB-Subtypen gemessen, während in unseren Messungen bei den GCB-Subtypen etwas stärkere Effekte erzielt wurden. Auf Proteinebene wurde unter Bortezomib mono in den GCB-Zelllinien eine vermehrte Expression von Raptor, ph-Raptor, Rictor, ph-mTOR, MAPK, MNK in ULA und ph-p90RSK1 in HBL-1 und damit eine Aktivierung vor allem des mTOR-Signalwegs messbar. Außerhalb dieses Signalwegs konnten noch PDK und BTK in ULA verstärkt exprimiert gemessen werden. Auch in den ABC-Zelllinien zeigten sich Effekte im PI3K-AKT-mTOR- Signalweg. In HBL-1 wurden Rictor, Raptor und BTK gesteigert exprimiert, ebenso ph-MEK und ph-PDK in der Zelllinie U2932. In beiden Zelllinien wurde interessanterweise ph-p90RSK1 vermindert exprimiert, in U2932 zusätzlich AKT. Insgesamt zeigten sich somit in beiden Subtypen teils gleichgerichtete, teils gegenläufige Effekte. Proteine beider mTOR-Komplexe und wesentliche in der Signalkaskade oberhalb lokalisierte Effektorkinasen wurden vermehrt gemessen, während ph-p90RSK1 in einer GCB-Zelllinie verstärkt, in den beiden ABC-Zelllinien vermindert exprimiert wurde. Bortezomib mit der einhergehenden Proteasomhemmung hatte hier zunächst keinen direkten Effekt auf die Proteinexpression der PI3K-AKT-mTOR-Achse. Möglicherweise ist die im Wesentlichen messbare Aktivierung der Achse als eine Art gegenläufige überlebensförderliche Stressantwort zu werten, die jedoch Apoptose und Reduktion der Gesamtzellzahl, ausgelöst durch direkte Bortezomib-Effekte, nicht aufhalten kann.

#### 5.2 Temsirolimus

Temsirolimus zeigte in den durchgeführten Dosisfindungsexperimenten die erwarteten Effekte. Sowohl in ABC- als auch in GCB-Zelllinien konnte ein reduziertes Zellwachstum beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 10 nM Temsirolimus wurde in ABC-Zelllinien eine mittlere Proliferationshemmung von 49,73% nach 72 Stunden Inkubation erreicht. Der gleiche Versuchsansatz erbrachte bei GCB-Zelllinien einen Mittelwert von 51,78% mit einer etwas größeren Spannweite von 30,04% in SU-DHL 5 bis 66,22% in der Zelllinie ULA. Diese Effekte waren von 0,1 nM bis 10 nM dosisabhängig, eine Dosiseskalation über 10 nM hinaus erbrachte außer in der Zelllinie ULA (100 nM: 48,85%) keinen weiteren messbaren Effekt. Insgesamt sahen wir daher 10 nM Temsirolimus als geeignete Dosis (IC<sub>50</sub>) für unsere weiteren Kombinationsexperimente. Die Vergleichbarkeit zwischen ABC- und GCB-Subtypen war durch die gleiche Dosierung gegeben. Die Viabilität der Zellen war selbst in Ansätzen mit hohen Konzentrationen (1  $\mu$ M Temsirolimus) nach 72 Stunden nur wenig verändert. Dies ließ bereits vermuten, dass die geringere Zellzahl unter Temsirolimus nicht durch Apoptoseinduktion zustande kam, sondern durch einen Zellzyklusarrest. An je einer ABC- (HBL-1) und GCB-Zelllinie (ULA) führten wir daher exemplarisch nach 48 Stunden Inkubationszeit Zellzyklusanalysen durch. Das Ergebnis zeigte jeweils einen Arrest in der G1/G0-Phase. Bei ULA war der Effekt deutlich stärker ausgeprägt (77,7% verglichen mit UTR 34,6%) als bei HBL-1 (50,9%; UTR 42,9%). Der G1/G0-Arrest ist in der Literatur für verschiedene mTOR-Inhibitoren beschrieben, auch an DLBCL-Zelllinien (Rapamycin, Everolimus an DB und SU-DHL 4)<sup>70</sup>. Messbare Apoptosewerte wurden in dieser Publikation nicht gezeigt. Die Apoptosemessung 48 Stunden nach Temsirolimus Behandlung an der Zelllinie OCI-LY 3 zeigte einen Anteil frühapoptotischer Zellen von 3,24% (UTR: 0,66%) und spätapoptotischer Zellen von 15,73% (UTR: 6,44). Somit ist die relative Zellzahlreduktion auf 54,87% nach 48 Stunden verglichen zur unbehandelten Kontrolle dem Zellzyklusarrest zuzuordnen, Apoptose spielt eine untergeordnete Rolle nach Inkubation mit Temsirolimus. Auf Proteinexpressionsebene wurde die Wirkung von Temsirolimus ebenfalls untersucht. Als direkter Effekt war in den meisten Zelllinien eine Dephosphorylierung von Raptor zu beobachten, auch weitere Effektorkinasen unterhalb des mTOR-Komplexes wie MNK waren reduziert exprimiert. In HBL-1 konnte auch gezeigt werden, dass mTOR dephosphoryliert wird. Es kam interessanterweise in allen Zelllinien übereinstimmend zu einer Dephosphorylierung von Rictor bzw. einer stark reduzierten Expression von ph-Rictor, teilweise sogar zum kompletten Expressionsverlust (ULA). Diese Beobachtung deckt sich nicht mit der gängigen Literatur, da meist davon ausgegangen wird, der mTORC2-Komplex mit dessen Bestandteil Rictor bliebe von einer Rapamycin- und Rapalog-Exposition unberührt<sup>1, 56</sup>. Einzelne Publikationen jedoch zeigen, dass dieses Dogma nicht zwangsweise zutreffend ist. Eine anhaltende Exposition über 24 Stunden gegenüber Rapamycin führte auch in anderen Arbeiten zu einer Dephosphorylierung von Rictor<sup>71</sup>.

#### 5.3 Ibrutinib

Ibrutinib erbrachte in den ABC-Zelllinien ein inhomogenes Ergebnis. Bei HBL-1 und OCI-LY 10 konnte die Zellprofileration durch geringe Dosen (2,5 nM) verringert werden, U2932 sprach auch auf hohe Konzentrationen (1 μM) nicht an. In der Zelllinie OCI-LY 3 wurde die Zellprofileration erwartungsgemäß schwach beeinflusst. Dies beruht auf der *CARD11*-Mutation, die in dieser Zelllinie nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse der Proliferationsversuche decken sich mit den Veröffentlichungen von Davis et al<sup>50</sup>; in unseren Versuchen konnten bei etwas geringerer Konzentration bereits die gleichen Veränderungen gezeigt werden. In den Zelllinien, die auf Ibrutinib ansprachen, zeigte sich in der absoluten Zellzahl zwischen 24 und 72 Stunden Inkubationszeit keinerlei Wachstum. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Honigberg et al, welche auf Proteinexpressionsebene bereits die irreversible Inhibition der Bruton`s Tyrosine Kinase durch eine kurze Inkubation mit Ibrutinib nachweisen konnten<sup>59</sup>. Wie erwartet, zeigten sich die GCB-Zelllinien im Wesentlichen unempfindlich gegenüber Ibrutinib. Bei einigen Zelllinien wurde ein schwacher Effekt gemessen, bei drei Zelllinien konnte man in der Dosisfindung mit unphysiologisch hohen Konzentrationen bis 1 µM eine Toxizität induzieren, die sich in vermehrtem Zelltod äußerte. Für GCB-Zelllinien liegen keine Veröffentlichungen zur Inkubation mit Ibrutinib vor. Davis et al inhibierten jedoch gezielt mittels small hairpin RNA BTK in einigen GCB-Zelllinien, wodurch sich keine verringerte Zellproliferation induzieren ließ. Dies ist der in diesen Zelllinien für das Wachstum nicht zwingend aktivierten B-Zell-Rezeptor-Signalkaskade zuzuordnen<sup>50, 69</sup>. Insgesamt entschieden wir uns für 2,5 nM als geeignete Dosierung für Kombinationsexperimente. In der Durchflusszytometrie zeigten sich in OCI-LY3 keine erhöhten Apoptosewerte. In den Zellzyklusanalysen konnte ein deutlicher G1/G0-Block in der ABC-Zelllinie HBL-1 gezeigt werden, in ULA nur eine leichte Verschiebung nach G1 und G2. Somit konnten wir zeigen, dass der G1/G0-Arrest verantwortlich ist für den Proliferationsstopp in Zelllinien, die auf Ibrutinib angesprochen haben. Auf Proteinexpressionsebene ließ sich bei Inkubation mit Ibrutinib in den Zelllinien HBL-1, ULA und HT eine Dephosphorylierung von AKT, in HT und U2932 auch von mTOR beobachten, zudem ist in der Zelllinie HT eine Dephosphorylierung von Rictor nachweisbar. Trotz der offensichtlichen Beeinflussung auf Proteinebene zeigten sich die beiden Zelllinien HT und U2932 im Wachstum nicht eingeschränkt durch Ibrutinib. In der auf Ibrutinib wenig sensiblen Zelllinie ULA wurden sogar entscheidende Komponenten des mTORC1- und mTORC2-Komplexes vermehrt exprimiert. Die Inhibierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalwegs durch Dephosphorylierungen entscheidender Kinasen nach Gabe von Ibrutinib ist vermutlich auf eine direkte Beteiligung von BTK in der Aktivierung von AKT zurückzuführen, wie sie in verschiedenen Zellreihen beispielsweise bei Craxton et al beschrieben ist<sup>72</sup>. Somit ist BTK nicht nur im NF-kB-Signalweg eine entscheidende Komponente.

#### 5.4 Idelalisib

Die Auswirkung einer Exposition gegenüber Idelalisib war unterschiedlich über alle verwendeten Zelllinien hinweg, unabhängig vom ABC- oder GCB-Subtyp. Sieben von zehn Zelllinien zeigten bereits bei geringeren Dosierungen im Bereich 100 nM ein erstes Ansprechen, welches sich dosisabhängig bis 10 µM noch steigern ließ. Die Zelllinie OCI-LY 3 sprach über alle verwendeten Konzentrationen gleichmäßig mit einer Viabilitätsreduktion auf 87,6% an. Kein Effekt wurde erzielt in den beiden GCB-Zelllinien DB und SU-DHL 4. Zu dem Zeitpunkt, als die Viabilitätsstudien durchgeführt wurden, waren PI3K-Inhibitoren und auch Idelalisib noch wenig erforscht. Unsere Ergebnisse sind kongruent mit einer von Lanutti veröffentlichten in vitro-Analyse aus 2011, in welcher an verschiedenen B-Zell-Malignitäten die Effektivität von Idelalisib an Zelllinien gezeigt wurde<sup>61</sup>. Die Zelllinie SU-DHL 5 war hier dosisabhängig bis 10 µM exponiert. Eine jüngst veröffentlichte Arbeit verwendete Idelalisib an den Zelllinien OCI-LY 10 und HBL-1 mit ähnlichen Ergebnissen in den Viabilitätsstudien<sup>73</sup>. In weiteren

Veröffentlichungen wurde nach Abschluss unserer Versuche gezeigt, dass bei Konzentrationen > 1 μM nicht mehr nur die p110 $\delta$ -Untereinheit, sondern nicht selektiv auch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten der PI3-Kinase gehemmt werden<sup>62</sup>. Wir verwendeten 5 µM als Konzentration in unseren Kombinationsexperimenten - retrospektiv eine Dosierung, welche wirkungsvoll war, wenngleich etwas weniger selektiv. Die Analyse der Zellzyklus-Veränderungen nach Inkubation mit Idelalisib zeigte in beiden untersuchten Zelllinien eine erhöhte G1/G0-Fraktion, wobei in der GCB-Zelllinie ULA, welche auch in den Viabilitätsversuchen deutlich auf Idelalisib reagierte, von einem G1/G0-Arrest gesprochen werden kann, da sich der Anteil von in diesem Stadium befindlichen Zellen beinahe verdoppelte (34,6% UTR vs. 61,5% Idelalisib). Eine Validierung durch Daten anderer Arbeitsgruppen kann mangels entsprechender Publikationen nicht erfolgen. Die Aussagekraft dieser Daten wird, abgesehen von der relativ hohen verwendeten Konzentration, jedoch durch mehrere Wiederholungen und eine geringe Standardabweichung unterstrichen. Dass die PI3-Kinase am Beginn verschiedener überlebenswichtiger Signalwege einzuordnen ist, ist hinlänglich bekannt und kann das verschiedenartige Ansprechen der untersuchten Zelllinien mit erklären. In der mäßig auf Idelalisib ansprechenden Zelllinie OCI-LY 3 führten wir eine Apoptosemessung durch, welche eine geringe Zunahme an früh- und spätapoptotischen Zellen zeigte. Lanutti et al konnten mittels Annexin-Staining eine deutliche erhöhte Apoptoserate in der Zelllinie SU-DHL 5 nachweisen, dosisabhängig ab einer Konzentration von 0,5 µM<sup>61</sup>. Diese Zelllinie zeigte auch in unseren Viabilitätsversuchen eine gute Reaktion auf Idelalisib ab einer Konzentration von 0,1 µM. Auf Proteinexpressionsebene führten wir mit Idelalisib keine weiteren Versuche durch. Es konnte durch andere Arbeitsgruppen mehrfach gezeigt werden, dass eine Inhibition von PI3K durch Idelalisib einen direkten Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus nachgeschalteter Kinasen im PI3K-AKT-mTOR-Signalweg hat, wobei insbesondere AKT und p70S6K sowie die IkB-Aktivität untersucht wurden. Eine sehr interessante Arbeit konnte in DLBCL-Zelllinien in vitro nachweisen, dass bei einer Inkubation mit Idelalisib innerhalb weniger Stunden durch einen Feedback-Mechanismus über die p110α-Untereinheit die PI3K-Aktivität wieder stark zunimmt und der Signalweg erneut aktiviert wird. Eine erneute Hinzugabe von Idelalisib zu den bereits inkubierten Zelllinien konnte diesen Effekt nicht verhindern<sup>61, 73</sup>. Die durch einen kombinierten PI3K $\alpha/\delta$ -Inhibitor erzielten Ergebnisse in ABC-DLBCL-Zelllinien zeigen, dass dieser Ansatz der Verwendung von Idelalisib mono in vitro deutlich überlegen ist, während in GCB-DLBCL und in OCI-LY 3 auch mit einem kombinierten Inhibitor keine relevanten Effekte erzielt wurden<sup>74</sup>. Dass PI3K und auch PDK1 weit oben in den Signalkaskaden eine zentrale Rolle einnehmen und in einigen ABC-DLBCL-Zelllinien sogar entscheidend für die Aktivierung des NF-kB-Signalweges sind, wurde durch die Arbeit von Kloo et al dargelegt und lässt PI3K weiter als interessantes Ziel erscheinen<sup>75</sup>.

#### 5.5 Kombinationsversuche

Auf der Basis der durchgeführten Monosubstanz-Versuche und der Kenntnis relevanter Signalwege wurde eine Reihe von Kombinationsexperimenten an den DLBCL-Zelllinien durchgeführt, deren Ergebnisse im folgenden Abschnitt diskutiert werden. Die Gewichtung hierbei lag vor allem auf der Erarbeitung möglicher sinnvoller Medikamentenkombinationen mit synergistischer Wirkung, dem Darstellen von Unterschieden der erzielten Effekte in den beiden DLBCL-Subtypen und deren Beobachtung auf Zellzyklus- und Proteinexpressionsebene. Es wurden alle vier untersuchten Substanzen einzeln mit den jeweils verbleibenden drei weiteren Substanzen in allen zehn zur Verfügung stehenden DLBCL-Zelllinien kombiniert.

#### 5.5.1 Kombinationsversuche mit Bortezomib

Die Kombination Bortezomib/Temsirolimus zeigte in allen Zelllinien unabhängig vom jeweiligen Subtyp eine jeweils antagonistische Wirkung. Besonders deutlich wurde dies in den GCB-Zelllinien DB, SU-DHL 5 und ULA sowie in den ABC-Zelllinien HBL-1 und OCI-LY 10. Die Zelllinien ULA und HBL-1 wurden auf Proteinexpressionsebene weiter untersucht. Interessant zu beobachten ist im Kombinationsansatz die vermehrte Expression von AKT und p70S6K in ULA. Besonders erwähnenswert erscheint der Effekt auf ph-PDK. In ULA wurde ph-PDK in der Kombination verstärkt exprimiert, während in HBL-1 eine verminderte Expression gemessen wurde. Trotzdem zeigten alle DLBCL-Zelllinien gleichgerichteten antagonistischen Effekt in der einen Kombination Bortezomib/Temsirolimus. Dieser spiegelt sich auch in den Zellzyklusanalysen in ULA und HBL-1 wider, in welchen im Vergleich zu den Einzelsubstanzen jeweils ein geringerer Anteil sich im G1/G0-Arrest befindlicher Zellen gemessen wurde. Die Apoptoserate in OCI-LY 3 in der Kombination lag mit 33,0% toten Zellen unter dem mit Bortezomib mono erreichten Wert von 43,6% (Temsirolimus 15,7%). Zum Zeitpunkt der Untersuchungen existierten keine veröffentlichten Daten zu dieser Kombination in DLBCL. Es lag eine Publikation über Bortezomib/Everolimus in Mantelzell-Lymphom-Zelllinien vor, welche in Proliferationsstudien einen synergistischen Effekt dieser Kombination messen konnten. Tiefergehende Experimente auf Zellzyklus- oder Proteinexpressionsebene wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt<sup>76</sup>.

Die Kombination Bortezomib/Ibrutinib zeigt in neun von zehn untersuchten Zelllinien einen additiven Effekt. Interessant ist die Betrachtung dieser Kombination in OCI-LY 3. Während die Monotherapie einen mäßigen Effekt unter Bortezomib und unter Ibrutinib keine messbare Proliferationshemmung erzeugt, beobachtet man in der Kombination beider Substanzen einen ausgeprägten überadditiven Effekt. In den durchgeführten Apoptosemessungen in OCI-LY 3 wird dies ebenfalls deutlich durch eine

über den Effekt der Bortezomib-Monotherapie hinausgehende Verschiebung zu früh- und spätapoptotischen Zellen. HBL-1 und ULA sprechen additiv auf die Inkubation an, in der Zellzyklus-Auswertung kommt es zu einer Verschiebung in die S-Phase. In den auf Proteinexpressionsebene untersuchten Zelllinien zeichnet die Kombination Bortezomib/Ibrutinib ein zu den jeweiligen Effekten der beiden Monosubstanzen ähnliches Bild. Das auffällig deutliche Ansprechen der Zelllinie OCI-LY 3 ist möglicherweise auf die nur in dieser Zelllinie bestehende CARD11-Mutation zurückzuführen. Die Arbeitsgruppe von Davis et al konnte zeigen, dass OCI-LY 3 auf eine Inhibition von BTK, welche in der Signalkaskade oberhalb von CARD11 liegt, kein Ansprechen zeigt, sehr wohl jedoch auf eine Inhibition der unterhalb liegenden IKK-ß<sup>50</sup>. Sie empfahlen daher bei mutCARD11-DLBCL eine Verwendung von Inhibitoren letzterer Kinase. Durch Bortezomib ist das Proteasom und somit letztlich auch IKK-ß blockiert, sodass der antiapoptotische Effekt dieses Signalweges aufgehoben wird. Dadurch zeigt sich erst der volle Effekt einer Inhibition von BTK, wodurch weitere antiapoptotische und proliferationsfördernde Signalwege gehemmt sind und die Zellen letztlich durch Apoptose oder Zellzyklusarrest zugrunde gehen bzw. ihre Teilungsfähigkeit verlieren. Eine überadditive Wirkung wird in der GCB-Gruppe nicht erreicht, welche bekanntermaßen jedoch auch nicht abhängig ist von einem dauerhaft aktivierten B-Zell-Rezeptor-Signalweg<sup>59, 77</sup>. Eine weitere Arbeitsgruppe kam in Untersuchungen an GCB- und ABC-DLBCL-Zelllinien zu ähnlichen Ergebnissen. Hier zeigten sich sogar synergistische Effekte der Kombination Bortezomib/Ibrutinib, unabhängig vom Subtyp. Die Autoren führten dies vor allem auf eine deutliche Dephosphorylierung von AKT zurück, welche in unserer Arbeit in drei von vier Zelllinien ebenfalls beobachtet werden konnte. Jedoch trat bei uns die Dephosphorylierung auch bereits unter Monotherapie mit Ibrutinib auf. Aufgrund dieser Erkenntnisse und klinischen Therapieerfolgen in Mantelzelllymphom und Multiplen Myelom erscheint uns und einer weiteren Arbeitsgruppe die bisher nicht publizierte klinische Testung der Kombination Bortezomib/Ibrutinib am DLBCL lohnenswert<sup>67</sup>.

In der Kombination Idelalisib mit Bortezomib beobachteten wir in vier von sechs Zelllinien der GCB-Gruppe und einer Zelllinie der ABC-Gruppe (HBL-1) additive Effekte. In der GCB-Gruppe kam es bei SU-DHL 5 und ULA zu einer leicht antagonistischen Wirkung, ebenso in den ABC-Subtypen bei OCI-LY 10 und sehr deutlich antagonistisch bei U2932. Die Zelllinie OCI-LY 3 sprach synergistisch auf die Kombination an. Hier wurden Apoptosemessungen durchgeführt, welche eine deutliche Zunahme des Anteils an spätapoptotischen Zellen offenlegten. Die Zellzyklusanalysen ergaben in den beiden untersuchten Zelllinien jeweils einen G1/G0-Arrest. In HBL-1 war dieser deutlicher, in ULA geringer ausgeprägt als in der Monotherapie mit Idelalisib, passend zur additiven bzw. rechnerisch antagonistischen Wirkung. Es liegen derzeit keine vergleichbaren publizierten Arbeiten vor, in welcher die Kombination Bortezomib mit Idelalisib am DLBCL untersucht wurde. Veröffentlichungen dieser Kombination gibt es im Bereich der Forschung am Mantelzelllymphom und dem Multiplen Myelom,

wobei jeweils synergistische Effekte beobachtet wurden<sup>78, 79</sup>. Die Arbeit von Park et al zeigt, dass in der DLBCL-Zelllinie HT nach einer Transfektion mit EBV durch die Kombination von Bortezomib und Idelalisib zuvor gegenüber der Monotherapie bestehende Resistenzen überwunden werden und synergistische Effekte zu beobachten sind. Dies wird hier vor allem auf die NF-κB-Blockade zurückgeführt<sup>80</sup>. Unsere verwendeten DLBCL-Zelllinien sind durchweg EBV<sup>-</sup>, das EBV<sup>+</sup>-DLBCL macht schwerpunktmäßig im asiatischen Raum ungefähr 10% aller DLBCL aus. Auf Proteinexpressionsebene wurden in dieser Kombination sowie in allen nachfolgend diskutierten Kombinationsexperimenten aus technisch-logistischen Gründen keine Experimente durchgeführt.

#### 5.5.2 Kombinationsversuche mit Temsirolimus

Temsirolimus mit Ibrutinib ergab in allen Wildtyp-ABC-Zelllinien additive Effekte, keinen Effekt beobachtete man hingegen in der Zelllinie OCI-LY 3 sowie in allen GCB-Zelllinien. Bemerkenswert ist der antagonistische Effekt dieser Kombination auf die Zelllinie ULA. Es muss beachtet werden, dass Ibrutinib als Monotherapeutikum in den meisten GCB-Zelllinien nur eine minimale Proliferationshemmung bewirkte, sodass formal additive Effekte mit Temsirolimus gemessen wurden, welche jedoch hauptsächlich auf Temsirolimus zurückzuführen waren. Die additiven Effekte in den ABC-Zelllinien zeigten sich exemplarisch auch in der Zellzyklusanalyse in HBL-1. Hier wurde der G1/G0-Arrest der beiden Einzelsubstanzen deutlich verstärkt. In ULA wurde der antagonistische Effekt durch die Zellzyklusanalyse nicht klarer beleuchtet, hier glichen die Kombinationseffekte denen von Temsirolimus mono. Diese Ergebnisse sind bis zum jetzigen Zeitpunkt nur durch unsere Arbeitsgruppe publiziert, eine Validierung an einem derart großen DLBCL-Zelllinienpanel durch andere Arbeitsgruppen ist bislang nicht erfolgt<sup>81</sup>. Eine 2014 veröffentlichte Arbeit ergab in OCI-LY 10 synergistische Effekte eines dualen mTOR-Inhibitors mit Ibrutinib<sup>82</sup>.

Temsirolimus und Idelalisib zeigten in allen ABC-Zelllinien additive Effekte, wobei in OCI-LY 3 ähnlich wie durch Ibrutinib auch durch Idelalisib mono keine Proliferationshemmung stattfand. In fünf von sechs GCB-Zelllinien, welche mit Ausnahme der Zelllinie DB auf beide Substanzen gut ansprachen, konnten additive Effekte nachgewiesen werden. Der leicht antagonistische Effekt in ULA erklärt sich durch das bereits sehr ausgeprägte Ansprechen auf die beiden Einzelsubstanzen. In der Zellzyklusanalyse in ULA war kein antagonistisches Ansprechen zu erkennen, hier bewirkte die Kombination einen G1/G0-Arrest, ebenso in der ABC-Zelllinie HBL-1. Insgesamt gibt es zu dieser Kombination derzeit keine vergleichbaren publizierten in vitro- oder in vivo-Daten.

## 5.5.3 Kombination Ibrutinib/Idelalisib

Abschließend untersucht und hier diskutiert wird die Kombination Ibrutinib mit Idelalisib. Alle GCB-Zelllinien erreichten in dieser Kombination additive bis synergistische Effekte. Beachtenswert ist hierbei die Zelllinie DB, welche auf die Einzelsubstanzen keine Reaktion zeigte, in welcher jedoch durch die Kombination eine absolut gesehen mäßige, jedoch signifikante Proliferationshemmung erzeugt werden kann. Ebenso additiv reagierten alle untersuchten ABC-Zelllinien, mit Ausnahme der *CARD11*-Mutation-Zelllinie OCI-LY 3. Im Gegensatz zur Kombination Bortezomib/Ibrutinib konnte durch Ibrutinib/Idelalisib der Effekt des dauerhaft aktivierten NF-κB-Signalwegs nicht durchbrochen werden. Dies ist sicherlich darauf zurückzuführen, dass beide inhibierten Kinasen in der Signalkaskade oberhalb von CARD11 liegen. In den Zellzyklusanalysen beobachteten wir in ULA und HBL-1 jeweils eine Zunahme der Zellen im G1/G0-Arrest. Zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen lagen keine wissenschaftlich publizierten Erkenntnisse zu dieser Kombination vor.

## 5.6 Wissenschaftliche Einordnung

Es bleibt zusammenfassend festzustellen, dass alle durchgeführten Einzelund Kombinationsexperimente, vergleichbare publizierte Studien vorausgesetzt, kongruent mit dem aktuellen Stand internationaler Forschung sind. Für einige der hier untersuchten Kombinationen existieren bis zum Zeitpunkt der schriftlichen Abfassung dieser Arbeit keine Daten, insbesondere nicht zu in vitro- Experimenten. Als besonders erwähnenswerte Ergebnisse werden der antagonistische Effekt von Bortezomib/Temsirolimus in allen untersuchten Zelllinien sowie das Verhalten der Zelllinie OCI-LY 3 betrachtet. Alle Kombinationen außer Bortezomib/Temsirolimus bewirken additive und synergistische Effekte der Proliferationshemmung unabhängig vom DLBCL-Subtyp – die Zelllinie OCI-LY 3 ausgenommen. Um den Transfer in klinische Studien möglichst effektiv und patientensicher zu gestalten, ist die Kenntnis des Subtyps dennoch zukunftsweisend und unerlässlich. Zusätzlich notwendig scheint aus den Erfahrungen der durchgeführten Experimente die Kenntnis des CARD11-Mutationsstatus im ABC-Subtyp zu sein. Dies wird verdeutlicht im Verhalten der Zelllinie OCI-LY 3. Während Kombinationen ohne Bortezomib in OCI-LY 3 durchweg antagonistische Effekte zeigen, spricht diese Zelllinie auf Bortezomib/Ibrutinib synergistisch an.

Ein besonderes Augenmerk galt den Proteinexpressionsanalysen der Kinasen aus durch die Therapeutika beeinflussten Signalwegen. Als eine der entscheidenden Achsen vor allem in GCB-DLBCL gilt der PI3K-AKT-mTOR-Pfad, in ABC-DLBCL spielt vor allem die permanente Aktivierung des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs eine wichtige Rolle. Unter Temsirolimus können wir eine Dephosphorylierung von PDK und Rictor in ABC- und GCB-Zelllinien beobachten, während Bortezomib auf den Phosphorylierungsstatus von PDK keinen Effekt hat. Bemerkenswerterweise kommt es unter der Kombination Bortezomib/Temsirolimus zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung von AKT in der GCB-Zelllinie ULA, wohingegen in der ABC-Zelllinie U2932 eine Dephosphorylierung vonstattengeht. Interessant ist auch der Phosphorylierungsstatus von PDK in dieser Kombination – die GCB-Zelllinie ULA zeigt eine vermehrte Phosphorylierung, beide untersuchten ABC-Zelllinien eine Dephosphorylierung. Der Antagonismus von Bortezomib/Temsirolimus kann somit auf Ebene der Proliferationsstudien gut beobachtet und durch Zellzyklusanalysen und Proteinexpressionsanalysen in seiner Bedeutung bestätigt werden. Ein negativer Feedbackloop durch Phosphorylierung von AKT durch Rictor wurde bereits mehrfach beschrieben<sup>25, 71</sup>, die Erkenntnisse aus unserer Arbeit lassen darauf schließen, dass zusätzlich auch dem Phosphorylierungsstatus von PDK eine Schlüsselfunktion beizumessen ist.

Alle Experimente unterliegen den bekannten Limitationen allgemeiner Zellkulturexperimente, Rückschlüsse auf eine mögliche klinische Anwendbarkeit dürfen nicht unreflektiert gezogen werden. Dies ist begründet in verschiedenen Faktoren. Zellkulturexperimente in dieser Größenordnung erfordern Versuche über mehrere Monate. Dies bedeutet, dass trotz höchster Sorgfalt hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Experimente gewisse Schwankungsbreiten auftreten. Die Zelllinien können nicht über Monate hinweg aus einem Ansatz vermehrt werden. Für neue Ansätze werden frische Zelllinien aus der Cryokonservation aufgetaut, anschließend neue Ansätze während stabiler Wachstumsphasen mit möglichst frischem Medium versorgt. Insbesondere bei den Serumzusätzen (FBS für acht Zelllinien und FFP für die Zelllinien OCI-LY 3 und OCI-LY 10) gibt es chargen- bzw. konservenabhängige Schwankungen der Zusammensetzung, beispielsweise der enthaltenen Konzentration an Wachstumsfaktoren<sup>83</sup>. Auf antiinfektive Zusätze wurde soweit möglich bewusst verzichtet, hier erschienen die regelmäßige klinische Beobachtung und apparative Testung auf Verunreinigung ausreichend. Lediglich bei der Verwendung von FFP als Plasmazusatz wurden Penicillin und Streptomycin zugefügt. Um möglichst vergleichbare Daten zu erhalten, wurden die Kombinationsexperimente an allen Zelllinien zeitgleich aus dem gleichen Zellansatz durchgeführt. Für Wiederholungsexperimente wurden im Verlauf teils frische Zellansätze verwendet.

Die Projizierbarkeit auf eine klinische Anwendung der hier getesteten Kombination ist limitiert aus mehreren Gesichtspunkten. Zum einen verhalten sich die hier verwendeten DLBCL-Zelllinien, wenngleich sie nicht artifiziell immortalisiert wurden, nicht sicher wie Tumorzellen in vivo. Das Zellmilieu spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Aufrechterhaltung der antiapoptotischen Signalwege der DLBCL-Zellen. Dies wurde insbesondere bei der Verwendung von Idelalisib gezeigt, welches in vivo die monozytäre Zytokinsekretion blockiert. Hier kam die Gruppe um Hoellenriegel und Burger zu dem Schluss, dass bei Idelalisib in vitro-Konzentrationen nicht linear korrelieren mit der in vivo-Aktivität des Medikaments<sup>62,84</sup>. Zum anderen unterliegen die meisten Chemotherapeutika und Immunmodulatoren in vivo den Prozessen der Pharmakokinetik, sodass ihre Konzentration nach Applikation abnimmt, was in vitro nicht nennenswert der Fall ist. Außerdem gilt es, die Verträglichkeit der Substanzen beim Menschen stets zu berücksichtigen, was zum Beispiel eine Dosisreduktion einer Einzelsubstanz oder eine zeitversetzte Gabe mehrerer Substanzen notwendig macht. Klinische Studien mit den hier in vitro untersuchten Kombinationen an DLBCL-Patienten, die auf die Standardtherapie mit R-CHOP oder DA-EPOCH nicht oder nur schlecht ansprechen, oder nach einer Phase der Remission Tumorrezidive erleiden, sind dennoch erstrebenswert. Um mögliche unerwünschte Nebenwirkungen oder ein fehlendes Ansprechen zu reduzieren bzw. zu vermeiden, ist die Kenntnis des Subtyps und der Mutationen entscheidender Signalwege vor Studieneinschluss zukunftsweisend. Untersuchungen zum klinischen Ansprechen auf alle verwendeten Einzelsubstanzen mit Beschreibung der Verträglichkeit liegen bereits vor. Durch Kombinationstherapien kann bei synergistischen und additiven Effekten möglicherweise ein gutes klinisches Ansprechen erreicht werden bei gleichzeitig möglicher Dosisreduktion der Einzelsubstanzen mit daraus resultierender Verbesserung der Verträglichkeit hinsichtlich Nebenwirkungen und deren Schweregrad.

## 5.7 Bezug zur Klinik

Bortezomib zeigte gute Erfolge als Ergänzung zur Zweitlinientherapie mit DA-EPOCH in therapierefraktären oder rezidivierten ABC-DLBCL<sup>53</sup>. Bei Hinzunahme von Bortezomib zur Erstlinientherapie mit R-CHOP gibt es kontroverse Studienergebnisse. In der Arbeit von Ruan et al ergab sich ein verbessertes Therapieansprechen in DLBCL des ABC-Subtyps, in der Studie von Offner et al war kein Vorteil im Vergleich zur primären Therapie ohne Bortezomib messbar<sup>52, 85</sup>. Mittlerweile wurde mit der *REMoDL-B*-Studie erstmals eine randomisiert-kontrollierte Arbeit veröffentlicht, in der Patienten mit DLBCL zunächst einen Zyklus R-CHOP erhielten. Währenddessen wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt und Subtypen des DLBCL identifiziert. Die Subgruppen wurden dann weiter randomisiert und erhielten entweder weiter R-CHOP oder zusätzlich Bortezomib. Der Beobachtungszeitraum lag bei 30 Monaten, es wurde kein Vorteil in einem Subtyp durch die Hinzunahme von Bortezomib festgestellt<sup>86</sup>.

Eine erste Arbeit mit der Kombination Bortezomib/Temsirolimus in therapierefraktären DLBCL-Patienten zeigte ein sehr heterogenes Ansprechen, wobei zwei Patienten eine komplette Remission erlangten. Es wurden keine Genexpressionsanalyse und keine Unterscheidung der DLBCL-Subtypen durchgeführt, sodass unklar bleibt, an welchem Subtyp die beiden Patienten mit Remission erkrankten<sup>87</sup>.

Temsirolimus ist als Monosubstanz in refraktären DLBCL-Patienten moderat wirksam, in der Untergruppe der GCB-DLBCL sowie in sekundär aus follikulären Lymphomen transformierte DLBCL zeigte sich ein gutes Ansprechen<sup>57</sup>. Aktuell läuft eine multizentrische Studie zur Ergänzung von Temsirolimus zum R-DHAP-Protokoll in rezidivierten oder therapieresistenten DLBCL-Patienten<sup>88</sup>.

Eine Differenzierung zwischen ABC- und GCB-Subtyp erfolgte in einer Studie mit Ibrutinib als Monosubstanz an therapierefraktären oder rezidivierten DLBCL-Patienten. Der Zeitpunkt der Subtyp-Klassifizierung bleibt unklar. Hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Ansprechen zugunsten der ABC-Gruppe. Ebenso untersucht wurde der CARD11-Status. Kein Patient mit CARD11-Mutation profitierte von Ibrutinib mono<sup>89</sup>. Die *Phoenix*-Studie ist eine randomisiert- kontrollierte, doppelblinde Phase-III-Studie, die sich auf Patienten mit ABC-DLBCL fokussiert hat und diese mit R-CHOP/Ibrutinib versus R-CHOP/Placebo behandelt hat. Der Subtyp wurde mittels Genexpressionsanalyse bestätigt, zuvor wurden die Patienten anhand immunhistochemischer Differenzierung rekrutiert. Hier zeigte sich für Patienten unter 60 Jahren ein Vorteil hinsichtlich Therapieansprechen und Gesamtüberleben während bei älteren Patienten aufgrund von häufigeren unerwünschten Nebenwirkungen die Therapie vermehrt abgebrochen werden musste und somit auch die Effektivität der Therapie reduziert war<sup>90</sup>.

Zu Idelalisib gibt es aktuell kaum klinische Studien mit DLBLC-Patienten, die aktuellen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es zum einen als Monotherapeutikum nur wenig erfolgsversprechend ist<sup>79</sup>. Zum anderen mussten zwei klinische Studien an Patienten aufgrund unerwartet hoher Toxizität abgebrochen werden. Dies war der Fall bei Idelalisib/Lenalidomid in Patienten mit Mantelzelllymphom und bei Idelalisib/GS-9973, einem Inhibitor der Syk-Kinase, in Patienten mit verschiedenen B-NHL inklusive Mantelzelllymphom und DLBCL<sup>91</sup>. In rezidivierten oder therapieresistenten Mantelzelllymphom-Patienten konnte mit Idelalisib mono ein Therapieansprechen von 40% erzielt werden<sup>92</sup>.

# 6 Zusammenfassung

Non-Hodgkin Lymphome sind weltweit und insbesondere in den Industrienationen eine relevant häufige Erkrankung und Todesursache. Den größten Anteil der aggressiven Non-Hodgkin Lymphomen stellt mit Abstand die Gruppe der Diffus großzelligen B-Zell Lymphome. Die Erstlinientherapie des DLBCL hat sich seit knapp 20 Jahren nur wenig verändert, ca. die Hälfte der Patienten kann mit dem R-CHOP-Therapieregime kurativ behandelt werden. Erleiden Patienten ein Rezidiv oder sprechen nicht auf die Erstlinientherapie an, ist die Prognose deutlich schlechter. Dies hat die Gruppe der DLBCL in den letzten Jahren zum Gegenstand intensiver Forschung gemacht. Zunächst durch Immunhistochemie, nun vor allem aber durch Genexpressionsprofile konnten die beiden Subtypen Activated B-cell like (ABC-) DLBCL und Germinal-centre B-cell like (GCB-) DLBCL identifiziert werden. Es wurden hierbei deutliche Unterschiede in deren Pathomechanismen der Lymphomgenese und der Tumorbiologie aufgezeigt, welche auch eine prognostische Relevanz besitzen. Die Kenntnis der wichtigen Signalwege und zentraler regulierender Kinasen hat zusammen mit einer modernen Pharmaindustrie zahlreiche neuartige Medikamente, vor allem Kinaseinhibitoren, hervorgebracht. Ein Teil davon ist bereits in B-Zell-Malignomen erprobt. Es galt nun herauszufinden, ob auch in DLBCL Wirksamkeit der Einzelsubstanzen Bortezomib, Temsirolimus, Ibrutinib, Idelalisib und deren Kombinationen besteht. Hierzu wurden zunächst einfache Proliferationsexperimente durchgeführt, stets an Zelllinien beider Subtypen, um Unterschiede zu erkennen.

Bortezomib als Einzelsubstanz war wirkungsvoll in allen DLBCL-Zelllinien, teils zeigte sich ein On-Off-Effekt in der Dosiseskalation. Temsirolimus bewirkte in allen Zelllinien, unabhängig vom Subtyp, einen ausgeprägten Proliferationsstopp. Die Wirkung war in erster Linie klassisch über eine Inhibition des mTORC1-Komplexes vermittelt, jedoch konnte auch eine Beeinflussung des mTORC2-Komplexes nachgewiesen werden. Der Effekt von Ibrutinib war insgesamt nicht konsistent. Bereits in den ABC-Zelllinien sprachen nur HBL-1 und OCI-LY 10 auf Ibrutinib an, erwartungsgemäß wurden in OCI-LY 3 keine Effekte erzielt. Unerwartet war jedoch der ausbleibende Effekt in der Zelllinie U2932. GCB-Zelllinien waren unempfindlich gegenüber Ibrutinib. Idelalisib als Monosubstanz war unabhängig vom Subtyp effektiv, eine in dieser Arbeit verwendete relativ hohe Dosierung vorausgesetzt.

Die reduzierte Zellzahl war bei Inkubation mit Bortezomib durch induzierte Apoptose bedingt, bei Temsirolimus, Ibrutinib und Idelalisib hauptsächlich durch einen Zellzyklusarrest. Dies wurde entsprechend in der Durchflusszytometrie für beide Subtypen exemplarisch bewiesen.

In den Kombinationsexperimenten fiel auf, dass Bortezomib/Temsirolimus in allen Zelllinien einen insgesamt antagonistischen Effekt zeigte, trotz guter Wirksamkeit der Einzelsubstanzen. Eine mögliche

Erklärung ist, dass sich die Effekte Apoptoseinduktion versus Proliferationsstopp kombiniert in ihrer Effektivität behindern.

Bortezomib/Ibrutinib ist rechnerisch additiv wirksam, wenngleich der Einzeleffekt von Ibrutinib in GCB-DLBCL vernachlässigbar ist. Durch Hinzunahme von Bortezomib konnte die durch die *CARD11*-Mutation bedingte Resistenz gegenüber Ibrutinib in OCI-LY 3 überwunden werden. Es wurden synergistische Effekte messbar und es kam vermehrt zu Apoptose.

Dieser Effekt wurde auch durch Bortezomib/Idelalisib in OCI-LY 3 erzielt, während die anderen Zelllinien gegenüber dieser Kombination inkonsistente Reaktionen zeigten unabhängig vom DLBCL-Subtyp. In Zelllinien mit additiven Effekten war jeweils ein verstärkter G1/G0-Arrest zu beobachten.

In ABC-DLBCL mit Wildtyp-*CARD11* konnten durch Temsirolimus/Ibrutinib gute Erfolge erzielt werden. Die Kombination Temsirolimus/Idelalisib war unabhängig vom Subtyp meist additiv in ihrem Effekt. Der Effekt von Idelalisib in GCB-Zelllinien wurde durch die Hinzunahme von Ibrutinib verstärkt, ebenso war die Kombination Ibrutinib/Idelalisib auch in allen ABC-Zelllinien außer OCI-LY 3 additiv.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass Bortezomib nicht mit Temsirolimus oder Idelalisib zeitgleich in DLBCL angewandt werden sollten. Bortezomib/Ibrutinib hat in ABC-DLBCL einen hohen Stellenwert, in GCB-DLBCL keine Relevanz. Idelalisib ist wirksam mit Temsirolimus und Ibrutinib. Der *CARD11*-Mutationsstatus sollte vor Therapiebeginn bekannt sein, für ABC-DLBCL mit mutiertem *CARD11* empfehlen sich besonders die Kombinationen Bortezomib/Ibrutinib oder Bortezomib/Idelalisib.

Die Proteinexpressionsanalysen lieferten ebenso wie die Zellzyklusanalysen wertvolle tiefgreifende Informationen. Oft war zu beobachten, dass Zelllinien dann additiv oder synergistisch auf eine Exposition gegenüber einer Medikamentenkombination reagieren, wenn die Einzelsubstanzen gleichgerichtete Effekte auf Zellzyklus, Apoptose oder auch Proteinexpression zeigten. Ist eine Lymphomprobe des Patienten durch eine geeignete diagnostische Maßnahme verfügbar, so sollten, wenn möglich, vor oder während einer Therapie mit Kinaseinhibitoren ähnliche Versuche in vitro durchgeführt werden, um ein Therapieansprechen in vivo möglicherweise besser vorhersagen oder steuern zu können.

# 7 Bibliographie

1. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. J Cell Sci. 2009;122(Pt 20):3589-3594.

2. Schulze-Luehrmann J, Ghosh S. Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. Immunity. 2006;25(5):701-715.

3. Anagnostopoulos I. Großzellige B-Zell-Lymphome Varianten und Entitäten. Der Pathologe. 2000;21(2):178-189.

4. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Blood. 1997;89(11):3909-3918.

5. Fisher SG, Fisher RI. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. Oncogene. 2004;23(38):6524-6534.

6. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 2010;127(12):2893-2917.

7. Keikawus A, Baenkler H-W, Bieber C, et al. Duale Reihe Innere Medizin. Georg Thieme Verlag, D; 2. Auflage; 2009.

8. Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, et al. Diffuse large B-cell lymphoma. Crit Rev Oncol Hematol. 2013;87(2):146-171.

9. Cultrera JL, Dalia SM. Diffuse large B-cell lymphoma: current strategies and future directions. Cancer Control. 2012;19(3):204-213.

10. Hermans J, Krol AD, van Groningen K, et al. International Prognostic Index for aggressive non-Hodgkin's lymphoma is valid for all malignancy grades. Blood. 1995;86(4):1460-1463.

11. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. J Clin Oncol. 2005;23(22):5027-5033.

12. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, et al. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. J Clin Oncol. 2010;28(14):2373-2380.

13. Blay J, Gomez F, Sebban C, et al. The International Prognostic Index correlates to survival in patients with aggressive lymphoma in relapse: analysis of the PARMA trial. Parma Group. Blood. 1998;92(10):3562-3568.

14. Dührsen U, Fidrik MA, Klapper W, et al. Leitlinien der Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO). <u>https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/diffuses-grosszelliges-b-zell-lymphom/@@guideline/html/index.html</u> 2018.

15. Chan JK. The new World Health Organization classification of lymphomas: the past, the present and the future. Hematol Oncol. 2001;19(4):129-150.

16. Cogliatti SB, Schmid U. Who is WHO and what was REAL? Swiss Med Wkly. 2002;132(43-44):607-617.

17. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature. 2000;403(6769):503-511.

Wright G, Tan B, Rosenwald A, et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(17):9991-9996.
Rosenwald A, Wright G, Chan WC, 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):1937-1947.

20. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. J Exp Med. 2003;198(6):851-862.

21. Dürkop H. 2008-WHO-Klassifikation der malignen Lymphome im Jahr 2011. Der Onkologe. 2011;17(769).

22. Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009:523-531.

23. Jaffe ES, Pittaluga S. Aggressive B-cell lymphomas: a review of new and old entities in the WHO classification. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2011;2011:506-514.

24. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood. 2016;127(20):2375-2390.

25. Populo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. Int J Mol Sci. 2012;13(2):1886-1918.

26. Limon JJ, Fruman DA. Akt and mTOR in B Cell Activation and Differentiation. Front Immunol. 2012;3:228.

27. Feng Z. p53 regulation of the IGF-1/AKT/mTOR pathways and the endosomal compartment. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(2):a001057.

28. Jozwiak J, Jozwiak S, Grzela T, et al. Positive and negative regulation of TSC2 activity and its effects on downstream effectors of the mTOR pathway. Neuromolecular Med. 2005;7(4):287-296.

29. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. N Engl J Med. 2010;362(15):1417-1429.

30. Lee DF, Kuo HP, Chen CT, et al. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. Cell. 2007;130(3):440-455.

31. Seda V, Mraz M. B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. Eur J Haematol. 2015;94(3):193-205.

32. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, 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):2285-2290.

33. Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD, et al. BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. Leukemia. 2012;26(6):1383-1390.

34. Iqbal J, Greiner TC, Patel K, 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):2332-2343.

35. Ci W, Polo JM, Cerchietti L, et al. The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. Blood. 2009;113(22):5536-5548.

36. Nogai H, Dorken B, Lenz G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol. 2011;29(14):1803-1811.

37. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. Nat Rev Immunol. 2008;8(1):22-33.

38. Lenz G, Nagel I, Siebert R, et al. Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. J Exp Med. 2007;204(3):633-643.

39. Lenz G, Wright GW, Emre NC, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(36):13520-13525.

40. Wlodarska I, Veyt E, De Paepe P, et al. FOXP1, a gene highly expressed in a subset of diffuse large B-cell lymphoma, is recurrently targeted by genomic aberrations. Leukemia. 2005;19(8):1299-1305.

41. Hu H, Wang B, Borde M, et al. Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. Nat Immunol. 2006;7(8):819-826.

42. Banham AH, Beasley N, Campo E, et al. The FOXP1 winged helix transcription factor is a novel candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p. Cancer Res. 2001;61(24):8820-8829.

43. Goatly A, Bacon CM, Nakamura S, et al. FOXP1 abnormalities in lymphoma: translocation breakpoint mapping reveals insights into deregulated transcriptional control. Mod Pathol. 2008;21(7):902-911.

44. Siebert R, Gesk S, Harder S, et al. Deletions in the long arm of chromosome 10 in lymphomas with t(14;18): a pathogenetic role of the tumor supressor genes PTEN/MMAC1 and MXI1? Blood. 1998;92(11):4487-4489.

45. Abubaker J, Bavi PP, Al-Harbi S, et al. PIK3CA mutations are mutually exclusive with PTEN loss in diffuse large B-cell lymphoma. Leukemia. 2007;21(11):2368-2370.

46. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, et al. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. Nat Immunol. 2008;9(4):405-414.

47. Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J, et al. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. J Exp Med. 2006;203(2):311-317.

48. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. Immunity. 2002;17(1):51-62.

49. Pasqualucci L, Bhagat G, Jankovic M, et al. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. Nat Genet. 2008;40(1):108-112.

50. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. Nature. 2010;463(7277):88-92.

51. Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. Blood. 2011;117(1):26-38.

52. Ruan J, Martin P, Furman RR, et al. Bortezomib plus CHOP-rituximab for previously untreated diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma. J Clin Oncol. 2011;29(6):690-697.

53. Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS, et al. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2009;113(24):6069-6076.

54. Leonard JP, Furman RR, Coleman M. Proteasome inhibition with bortezomib: a new therapeutic strategy for non-Hodgkin's lymphoma. Int J Cancer. 2006;119(5):971-979.

55. Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, et al. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. J Clin Oncol. 2005;23(3):630-639.

56. Rini BI. Temsirolimus, an inhibitor of mammalian target of rapamycin. Clin Cancer Res. 2008;14(5):1286-1290.

57. Smith SM, van Besien K, Karrison T, et al. Temsirolimus has activity in non-mantle cell non-Hodgkin's lymphoma subtypes: The University of Chicago phase II consortium. J Clin Oncol. 2010;28(31):4740-4746.

58. Samad N, Younes A. Temsirolimus in the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. Onco Targets Ther. 2010;3:167-178.

59. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(29):13075-13080.

60. Wang ML, Rule S, Martin P, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantlecell lymphoma. N Engl J Med. 2013;369(6):507-516.

61. Lannutti BJ, Meadows SA, Herman SE, 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):591-594.

62. So L, Fruman DA. PI3K signalling in B- and T-lymphocytes: new developments and therapeutic advances. Biochem J. 2012;442(3):465-481.

63. Gopal AK, Kahl BS, Flowers CR, et al. Idelalisib is effective in patients with high-risk follicular lymphoma and early relapse after initial chemoimmunotherapy. Blood. 2017;129(22):3037-3039.

64. Drexler HG. Guide to Leukemia-Lymphoma Cell Lines. 2nd Edition Braunschweig, 2010.

65. Chang H, Blondal JA, Benchimol S, et al. p53 mutations, c-myc and bcl-2 rearrangements in human non-Hodgkin's lymphoma cell lines. Leuk Lymphoma. 1995;19(1-2):165-171.

66. Webb JL. Enzyme and metabolic inhibitors. New York: Academic Press 1963.

67. Dasmahapatra G, Patel H, Dent P, et al. The Bruton tyrosine kinase (BTK) inhibitor PCI-32765 synergistically increases proteasome inhibitor activity in diffuse large-B cell lymphoma (DLBCL) and mantle cell lymphoma (MCL) cells sensitive or resistant to bortezomib. Br J Haematol. 2013;161(1):43-56.

68. Strauss SJ, Higginbottom K, Juliger S, et al. The proteasome inhibitor bortezomib acts independently of p53 and induces cell death via apoptosis and mitotic catastrophe in B-cell lymphoma cell lines. Cancer Res. 2007;67(6):2783-2790.

69. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, et al. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. J Exp Med. 2001;194(12):1861-1874.

70. Wanner K, Hipp S, Oelsner M, et al. Mammalian target of rapamycin inhibition induces cell cycle arrest in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) cells and sensitises DLBCL cells to rituximab. Br J Haematol. 2006;134(5):475-484.

71. Zeng Z, Sarbassov dos D, Samudio IJ, et al. Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. Blood. 2007;109(8):3509-3512.

72. Craxton A, Jiang A, Kurosaki T, et al. Syk and Bruton's tyrosine kinase are required for B cell antigen receptor-mediated activation of the kinase Akt. J Biol Chem. 1999;274(43):30644-30650.

73. Pongas GN, Annunziata CM, Staudt LM. PI3Kdelta inhibition causes feedback activation of PI3Kalpha in the ABC subtype of diffuse large B-cell lymphoma. Oncotarget. 2017;8(47):81794-81802.

74. Erdmann T, Klener P, Lynch JT, et al. Sensitivity to PI3K and AKT inhibitors is mediated by divergent molecular mechanisms in subtypes of DLBCL. Blood. 2017;130(3):310-322.

75. Kloo B, Nagel D, Pfeifer M, et al. Critical role of PI3K signaling for NF-kappaB-dependent survival in a subset of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(1):272-277.

76. Haritunians T, Mori A, O'Kelly J, et al. Antiproliferative activity of RAD001 (everolimus) as a single agent and combined with other agents in mantle cell lymphoma. Leukemia. 2007;21(2):333-339.

77. Mahadevan D, Fisher RI. Novel therapeutics for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol. 2011;29(14):1876-1884.

78. Ikeda H, Hideshima T, Fulciniti M, et al. PI3K/p110{delta} is a novel therapeutic target in multiple myeloma. Blood. 2010;116(9):1460-1468.

79. Jerkeman M, Hallek M, Dreyling M, et al. Targeting of B-cell receptor signalling in B-cell malignancies. J Intern Med. 2017;282(5):415-428.

80. Park GB, Chung YH, Jeong JY, et al. A p110delta-specific inhibitor combined with bortezomib blocks drug resistance properties of EBV-related B cell origin cancer cells via regulation of NF-kappaB. Int J Oncol. 2017;50(5):1711-1720.

81. Zoellner AK, Bayerl S, Hutter G, et al. Temsirolimus inhibits cell growth in combination with inhibitors of the B-cell receptor pathway. Leuk Lymphoma. 2015;56(12):3393-3400.

82. Ezell SA, Mayo M, Bihani T, et al. Synergistic induction of apoptosis by combination of BTK and dual mTORC1/2 inhibitors in diffuse large B cell lymphoma. Oncotarget. 2014;5(13):4990-5001.

83. Coecke S, Balls M, Bowe G, et al. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. Altern Lab Anim. 2005;33(3):261-287.

84. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2011;118(13):3603-3612.

85. Offner F, Samoilova O, Osmanov E, et al. Frontline rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone with bortezomib (VR-CAP) or vincristine (R-CHOP) for non-GCB DLBCL. Blood. 2015;126(16):1893-1901.

86. Davies A, Cummin TE, Barrans S, et al. Gene-expression profiling of bortezomib added to standard chemoimmunotherapy for diffuse large B-cell lymphoma (REMoDL-B): an open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2019;20(5):649-662.

87. Fenske TS, Shah NM, Kim KM, et al. A phase 2 study of weekly temsirolimus and bortezomib for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: A Wisconsin Oncology Network study. Cancer. 2015;121(19):3465-3471.

88. Witzens-Harig M, Memmer ML, Dreyling M, et al. A phase I/II trial to evaluate the safety, feasibility and activity of salvage therapy consisting of the mTOR inhibitor Temsirolimus added to standard therapy of Rituximab and DHAP for the treatment of patients with relapsed or refractory diffuse large cell B-Cell lymphoma - the STORM trial. BMC Cancer. 2013;13:308.

89. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. Nat Med. 2015;21(8):922-926.

90. Younes A, Sehn LH, Johnson P, et al. Randomized Phase III Trial of Ibrutinib and Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Non-Germinal Center B-Cell Diffuse Large B-Cell Lymphoma. J Clin Oncol. 2019;37(15):1285-1295.

91. Graf SA, Gopal AK. Idelalisib for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. Expert Opin Pharmacother. 2016;17(2):265-274.

92. Kahl BS, Spurgeon SE, Furman RR, et al. A phase 1 study of the PI3Kdelta inhibitor idelalisib in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma (MCL). Blood. 2014;123(22):3398-3405.

# 8 Abkürzungsverzeichnis

4EBP1	eucaryotic translation initiation factor 4E-binding protein
ABC	activated B-cell like
AID	activation-induced cytidine deaminase
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
АМРК	AMP- activated protein kinase
BAFF	B-cell activating factor
BCL2	B-cell lymphoma 2
BLIMP1	B-lymphocyte-induced maturation protein-1
ВТК	Bruton's Tyrosin Kinase
CD (+Nummer)	Cluster of Differentiation
CSR	class switch recombination
DAG	Diacylglycerol
Deptor	DEP-domain-containing mTOR-interacting protein
DLBCL	Diffuse large b-cell lymphoma (engl. Diffus großzelliges B-Zell Lymphom)
DIVISO	Dimetynisulloxid
	Desoxyribonukleinsaure
EBV	Epstein-Barr-Virus
eir4t	eukaryotic translation initiation factor 4E
ERK	extracellular-signal regulated kinase
FACS	
FBS	fetal bovine serum, Fotales Kalberserum
	U.S. Food and Drug Administration
FFP	fresh frozen plasma
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FOXP1	Forkhead Box P1
GCB	germinal-centre like
GDP	Guanosin-Diphosphat
GTP	Guanosin-Triphosphat
HHV	Humanes Herpesvirus
HIF	Hypoxia-inducible Factor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
lg	Immunglobulin
IGF1	Insulin-like growth factor 1
ILSG	International Lymphoma Study Group
IPI	International prognostiv index
IRS1	insulin receptor substrate 1
ITAM	Immunoreceptor-tyrosine-based activation motif

МАРК	Mitogen-activated protein kinase
mLST8	mammalian lethal with Sec13 protein 8
MNK	Mitogen-activated protein kinase (MAPK) interacting protein kinase
mSin1	mammalian stress-activated protein kinase interacting protein
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NF-κB	nuclear factor kappa B
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
OR (auch ORR)	Overall response rate (engl. Gesamtansprechen)
PDK1	Phosphoinositide-dependent Kinase-1
РІЗК	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5,-diphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5,-triphosphat
ΡΚCβ	Proteinkinase Cβ
ΡLCγ	Phospholipase Cγ
PMBL	primär mediastinales großzelliges B-Zell Lymphom
PMBL	Primär mediastinales B-Zell Lymphom
PRAS40	proline-rich AKT substrate 40kDa
Protor-1	protein observed with Rictor-1
PTEN	phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten
Raf	Rat fibrosarcoma
Rag	recombination-activating genes
Raptor	regulatory-associated protein of mTOR
Ras	Rat sarcoma
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
REAL	Revised European-American Lymphoma
REDD1	DNA damage response 1
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNA	Ribonukleinsäure
RSK	Ribosomale S6-Kinase
SDS	Sodium dodecyl sulfat (engl. Natriumdodecylsulfat)
SHM	somatische Hypermutation
shRNA	Small hairpin RNA
SMA	small molecule agents
TBST	TRIS-buffered Saline Tween
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF6	TNF-Rezeptor assozierten Faktor 6
TSC1	tuberous sclerosis complex 1

# 9 Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

- Zoellner AK, Bayerl S, Weinkauf M, Heß G, Hiddemann W, Dreyling M:

"Differential role of the B-Cell receptor pathway in diffuse large cell B cell lymphoma: Temsirolimus has additive effects in combination with the BTK inhibitor PCI-32765 and PI3K inhibitor Cal101 but antagonizes Bortezomib in GCB subtype"

Posterpräsentation im Rahmen der Postersession am American Society of Hematology (ASH) 53<sup>rd</sup> Annual Meeting, Dez 2011, San Diego U.S.

- Zoellner AK, Bayerl S, Hutter G, Zimmermann Y, Hiddemann W, Dreyling M:

# "Temsirolimus inhibits cell growth in combination with inhibitors of the B-cell receptor pathway"

Leuk Lymphoma. 2015;56(12):3393-400. doi: 10.3109/10428194.2015.1023720. Epub 2015 Aug 3.

# 10 Danksagung

Ein großer Dank gilt meiner gesamten Arbeitsgruppe, allen voran Herrn Prof. Dr. Martin Dreyling, der mir die Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat, stets positiv bestärkend meine Motivation aufrecht erhielt und mir durch seine innovativen Ideen die Möglichkeit gab, einige gute Ergebnisse wohlplatziert zu veröffentlichen. Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, besonders aber meinen Mentoren Dr. Anna Zöllner und Dr. Marc Weinkauf möchte ich ein herzliches "Dankeschön" aussprechen. Sie standen stets mit Rat und Tat zur Seite und lenkten die Arbeit in geordnete und zielgerichtete Bahnen. Meinen Lehrern in Theorie und Praxis der Laborkünste Dr. Grit Hutter und Yvonne Zimmermann möchte ich ebenso ein großes Lob und einen großen Dank aussprechen für ihre geduldsame Anleitung und Einarbeitung in verschiedene Methoden. Meiner Laborpartnerin Dr. Tina Lautenschläger gratuliere ich zur gelungenen Promotion und bedanke mich für zahlreiche kurzweilige Stunden, die das Arbeiten stets erträglich erschienen ließen.

Abschließend möchte ich den wichtigsten Personen in meinem Leben danken – meiner Familie und meiner Frau Lisa. Nur durch die Unterstützung meiner Familie war es mir möglich, ein Studium aufnehmen. Die mit der Arbeit im Labor verbundenen unzähligen Stunden und meine damit einhergehende Abwesenheit wurden von meiner Frau und meiner Familie stets verständnisvoll aufgenommen und gefördert. Danke!