

Aus der Medizinischen Klinik III - Großhadern  
Klinik der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

**Targeted Therapie beim Mantelzelllymphom unter  
besonderer Berücksichtigung des  
B-Zell-Rezeptors**

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

vorgelegt von Bianca Freysoldt  
aus Friedrichshafen

München  
2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Martin Dreyling
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Ralf Schmidmaier PD Dr. Reinhard Obst
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Andrea Mayer
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	07.07.2022

# Inhaltsverzeichnis

1. Einführung in die Grundlagen .....	3
1.1 Das Mantelzelllymphom.....	3
1.1.1 Definition und Epidemiologie .....	3
1.1.2 Morphologie .....	3
1.1.3 Immuntypisierung der MCL-Zellen .....	4
1.1.4 Zytogenetik und molekulare Pathogenese.....	5
1.1.5 Klinik, Verlauf und Prognoseparameter .....	8
1.1.6 Therapie.....	9
1.2 Die PIM-Kinasen.....	14
1.2.1 Die PIM-Kinasen Familie .....	14
1.2.2 Physiologische Funktion .....	16
1.2.3 PIM-Kinasen und maligne Tumore.....	19
1.2.4 PIM-Kinasen Inhibitoren.....	21
1.3 Der PI3K/Akt/mTor-Signalweg .....	24
1.3.1 PI3K/Akt/mTor .....	24
1.3.2 Dysregulation des PI3K/Akt/mTor-Signalweg in Tumoren und MCL .....	27
1.3.3 Pharmakologische Inhibition des PI3K/Akt/mTor-Signalweg .....	28
2. Das Ziel dieser Arbeit.....	30
3. Material und Methodik.....	31
3.1 Material.....	31
3.1.1 Verwendete Zelllinien.....	31
3.1.2 Verwendete Inhibitoren .....	31
3.1.3 Verwendete Antikörper .....	32
3.1.4 Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen.....	33
3.1.5 Verwendete Geräte.....	35
3.2 Methoden .....	36
3.2.1 Zellkulturbedingungen.....	36
3.2.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	36

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität mittels Vi-Cell™ .....	36
3.2.4 Zelltodanalyse mit Annexin V-PE und 7-AAD-Färbung.....	37
3.2.5 Zellzyklusanalyse.....	39
3.2.6 Western Blot .....	40
3.2.7 WST-1 Zell-Proliferationsassay .....	41
3.2.8 Cell-Titer-Glo®.....	42
3.2.9 Kombinationsversuche und Kombinationsindices – Fraction of Product .....	43
3.2.10 Umgang mit primären Zellen.....	44
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
4.1 Dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung durch IBL- 202 und IBL-301 .....	46
4.2 Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit IBL-202 und IBL-301. ....	52
4.3 Spezifische Apoptoseanalyse nach Behandlung mit IBL-202 und IBL-301 .....	58
4.4 Proteinanalyse nach Behandlung mit IBL-202 und IBL-301 .....	61
4.5 WST-1 Kombinationsassays.....	66
4.6 Zell-Viabilitäts Essay mit primären Zellen .....	71
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>75</b>
<b>6. Ausblick.....</b>	<b>85</b>
<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>87</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>10. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>91</b>
<b>11. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>94</b>
<b>12. Danksagung .....</b>	<b>115</b>

# 1. Einführung in die Grundlagen

## 1.1 Das Mantelzelllymphom

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das Mantelzelllymphom (MCL) gehört zu den reifen B-Zell Neoplasien der Non-Hodgkin Lymphome [1], dessen Charakteristikum die Translokation t(11;14)(q13;q32) ist [2], [3], [4]. Mit Hilfe der FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) kann die Translokation zuverlässig und vergleichsweise einfach nachgewiesen werden [5].

Im Jahre 1994 wurde das MCL in den REAL-Kriterien (revised European-American Lymphoma classification) erstmals als eigenständige Entität den peripheren B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen zugeordnet [6]. Dies wurde später auch in den von der World Health Organisation (WHO) 2001 veröffentlichten Kriterien übernommen, die 2016 aktualisierte Version stellt heute den weltweiten Standard in der Einteilung der Lymphome dar [7].

Von allen Non-Hodgkin Lymphomen macht das MCL etwa 6% der Fälle aus, dabei ist mit 74% die Mehrheit der Patienten männlich. Bei Erstdiagnose beträgt das durchschnittliche Alter 63 Jahre und die Krankheit liegt meist bereits als Ann Arbor Stadium III oder IV vor [8]. Zwischen 2000 und 2002 lag die Inzidenzrate des MCL bei 0.45 pro 100.000 Einwohnern, basierend auf Daten aus dem Krebsregister von 20 Europäischer Staaten [9]. Eine Studie aus den USA konnte im Zeitraum von 1990-2004 allerdings eine starke Zunahme der Inzidenz feststellen [10]. Das MCL gehört zu den aggressiven Lymphomen, die Zeit bis zur Krankheitsprogression und die Gesamtüberlebenszeit ist beim MCL von allen Non-Hodgkin Lymphomen mit am kürzesten [8].

### 1.1.2 Morphologie

In der Zytologie findet sich in den meisten Patienten mit Mantelzelllymphom der

sogenannte klassische Typ, eine einheitliche Proliferation von atypischen, kleinen bis mittelgroßen Lymphozyten, die einen unauffälligen oder irregulären und eingekerbten Nukleus vorweisen [11]. Ebenso zeichnen sich die Zellen durch einen engen Rand von basophilem Zytoplasma aus [12].

In etwa 10-15% der Fälle finden sich jedoch im Vergleich größere neoplastische Zellen, die morphologisch durch feinverteiltes Chromatin und kaum erkennbare Nucleoli auffallen, die sogenannte blastoide Variante [11]. Auch ein polymorphes Erscheinungsbild wurde beschrieben, welches die Differentialdiagnose zu B-CLL oder diffus großzelligem B-Zell-Lymphom erschwert [12]. Auch wenn sich die Patienten im klinisch-biologischen Erscheinungsbild der Erkrankung nicht signifikant unterscheiden, lässt sich ein deutlicher Unterschied im medianen Überleben nach Diagnosestellung feststellen. Dieses liegt beim blastoiden Typ bei durchschnittlich 14,5 Monaten, dazu stehen im Gegensatz 53 Monate beim klassischen Typ [13].

Histologisch kann zwischen drei Wachstumsmustern des malignen Infiltrats unterschieden werden, diffus, nodulär und in der Mantelzone der Lymphfollikel [6], wobei das diffuse Wachstum mit 61% weit am häufigsten vorkommt. Diese gehen mit unterschiedlichen klinischen Verläufen einher, so zeigt sich ein 3-Jahres Überleben von 100% bei der ausschließlichen Infiltration der Mantelzone, aber nur von 55% bei diffusem bzw. 50% bei nodulärem Wachstum [14]. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die drei Wachstumsmuster die natürliche Krankheitsprogredienz widerspiegeln [15].

### **1.1.3 Immuntypisierung der MCL-Zellen**

Die Zellen des Mantelzelllymphoms zeigen einen kennzeichnenden Phänotyp von reifen B-Zellen [16], die Pan-B-Zell Marker CD19, CD20, CD22 und CD79a werden exprimiert, ebenso wie IgM und/oder IgD auf der Oberfläche [17], [18], [19]. Weiterhin wird Cyclin D1 exprimiert, kontinuierlich und unabhängig von exogenen Faktoren. Dagegen sind MCL Zellen negativ für CD10 [17].

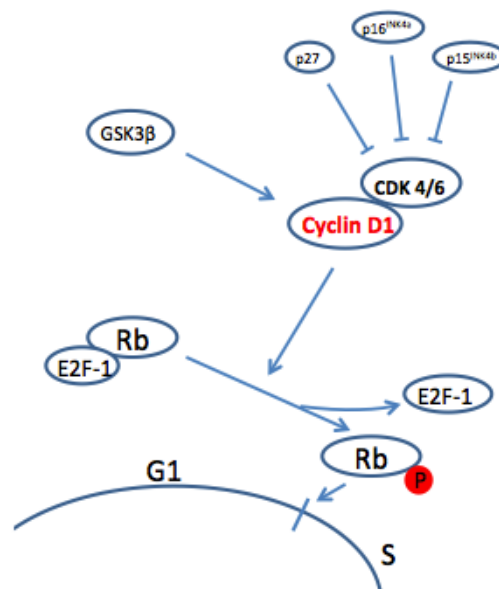
Die Abwesenheit von CD23 macht man sich bei der Abgrenzung des MCL zur B-CLL zu Nutze. Ebenso kann durch die im MCL vorhandene Expression des T-Zell-assoziierten CD5 eine Differenzierung zum folliculären Lymphom erfolgen [6].

In der Literatur wurden auch Abweichungen von dem typischen Phänotyp beschrieben, diese können die Expression von CD5, CD10 oder CD23 betreffen [18].

#### **1.1.4 Zytogenetik und molekulare Pathogenese**

Auf molekularer Ebene ist wie anfangs bereits erwähnt das Kennzeichen des MCL die Translokation von t(11;14)(q13;q32) [2], [3], [4]. Durch diese reziproke Translokation sind zwei genkodierende Regionen betroffen, auf Chromosom 14 ist dies der Genlocus für die schweren Immunglobulinketten (*IGHV*). Des Weiteren ist die Region 11q13 auf Chromosom 11 beeinflusst, die auch als *BCL-1* (B-Cell-Lymphoma 1) tituliert wird [20], [21]. Früher aufgrund der Erstbeschreibung bei Nebenschilddrüsenadenomen als *PRAD1* (parathyroid adenomatosis) bezeichnet [22], [23], wird dieses Gen in Anlehnung an sein Genprodukt Cyclin D1 heute mit dem offiziellen Namen *CCND1* geführt [24]. Die Translokation beim MCL führt dazu, dass der für Cyclin D1 kodierende Locus des *BCL-1* dem Promotor für IgH unterstellt wird und somit Cyclin D1 überexprimiert wird. Cyclin D1 spielt für den Zellzyklus eine bedeutende Rolle, zusammen mit den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) bildet es eine enzymatische Einheit, die das Rb-Protein (Retinoblastom) phosphoryliert. Dieses verliert dadurch seine Bindung und hemmende Wirkung auf den Transkriptionsfaktor E2F-1 und ermöglicht somit der Zelle den Übergang von der G1 zur S-Phase [25], [26], [27]. Höhere Cyclin D1 mRNA Level bedeuten hierbei ein schnelleres Tumorwachstum und damit eine verkürzte Überlebenszeit [28]. Darüber hinaus wurde in hochproliferativen Tumoren Cyclin D1-mRNA gefunden, denen Teile der 3'UTR fehlten. Diese kürzeren mRNAs sind stabiler und generierten vermehrt Protein, was den Effekt der vermehrten Translokation

damit nochmals verstärkt [29]. Die erhöhte Expression von Cyclin D1 ist kennzeichnend für das MCL und damit richtungsweisend in der Diagnosestellung, dennoch sind auch Cyclin negative MCL-Fälle bekannt, denen dementsprechend auch die typische t(11;14)(q13;q32) Translokation fehlt. Klinisch und morphologisch unterscheiden sie sich nicht von den Cyclin D1-positiven MCLs, ebenso wenig wie in der Überlebenszeit. Manche Cyclin D1-negative Tumore zeigten als Kompensation eine verstärkte Expression von Cyclin D2 oder D3, was darauf hindeutet, dass diese Proteine funktionellen Ersatz in den Zellen darstellen [30], [28]. Bei Cyclin D1-negativen MCLs kann als Diagnosehilfe der Transkriptionsfaktor SOX11 herangezogen werden, der unabhängig von der Cyclin-D1 Expression im MCL stark erhöht ist [31].



nach [17]

Abbildung 1: Interaktionen zwischen den Zellzyklusproteinen am Übergang von der G1 zur S-Phase

Vereinfachte Darstellung. Pfeile bedeuten Aktivierung, Pfeile mit Querstrich eine Hemmung.

In der 2016 erschienenen Revision der Einteilung der Lymphome werden die zwei Subtypen des MCL mit unterschiedlichen Manifestationsorten und molekularen Pathogenesen verstanden. Die klassische Form des MCL manifestiert



sich in den Lymphknoten und anderem extranodalen Gewebe, äußert sich meist mit minimal bzw. unmutiertem *IGHV* und exprimiert für gewöhnlich *SOX11*. Kommen weitere molekulare bzw. zytogenetische Veränderungen hinzu, kann dies zu der aggressiveren Variante des blastoiden oder pleomorphen MCL führen [7].

Das MCL präsentiert sich häufig mit weiteren defekten regulatorischen Proteinen des Zellzyklus, vor allem in der aggressiveren blastoiden Form. Verlust von  $p16^{\text{INK4a}}$ , einem CDK-Inhibitor, wurde in 3 von 7 (43%) blastoiden MCLs aber nur in 1 von 21 (5%) der klassischen MCLs gefunden. Das Defizit von  $p16^{\text{INK4a}}$  geht regelmäßig mit dem Verlust von  $p15^{\text{INK4b}}$ , einem weiteren CDK-Inhibitor [32], und Veränderungen von  $p14^{\text{ARF}}$  einher. Das Tumorsuppressorgen *p53* ist ebenfalls häufiger in blastoiden MCLs verändert [33]. Die Proteinlevel des CDK-Inhibitors *p27* sind in 83% der MCLs erniedrigt oder nicht nachweisbar, dies liegt jedoch weniger an verminderter Proteinbiosynthese, sondern vielmehr an einem erhöhten Abbau dessen. Fehlender Nachweis von *p27* korreliert dabei mit einem kürzeren Überleben des Patienten [34].

In bis zu 75% der Patienten mit MCL liegt eine Inaktivierung der Serin-Protein-kinase ATM (Ataxia telangiectasia Mutated) durch Mutationen oder Deletion des Gens vor [35]. ATM ist in der DNA-Reparatur beteiligt und kann Doppelstrangbrüche der DNA erkennen. Darauf aktiviert sie eine Reihe von Zellzykluskontrollpunkten, darunter u.a. auch P53, um einen Eintritt in die Mitose bei schwerwiegenden DNA-Schäden zu verhindern [36], [17]. Kommt es zu einem Verlust der *ATM*, steigt das Risiko von Chromosomentranslokationen während der V(D)J-Rekombination [37] in deren Verlauf es natürlicherweise zu solchen Doppelstrangbrüchen kommt [38].

Andere genetische Veränderungen des MCL betreffen das Überleben der Zellen. So lassen sich in einem Teil der Patienten hohe Proteinlevel von Bcl-2 nachweisen, dies hat einen antiapoptotischen Effekt [39]. *NOTCH1*, kodierend für ein Transmembranprotein das durch Liganden aktiviert und anschließend als Transkriptionsfaktor fungiert [40], zeigte sich in 12% von MCL-Patienten mutiert. Eine Mutation von *NOTCH1* ist mit einer schlechten Prognose assoziiert [41].

Ein weiteres Kennzeichen des MCL sind zahlreiche fehlregulierte Signalwege auf molekularer Basis [40]. Darunter fällt unter anderem der PI3K/Akt/mTor-Signalweg [42], welcher in einem eigenen Kapitel beschrieben wird. Andere dysregulierte Signalwege sind der B-Zell-Rezeptor Signalweg, sowie JAK-STAT [43], WNT [44], [45] und NF- $\kappa$ B [46].

### **1.1.5 Klinik, Verlauf und Prognoseparameter**

Die meisten MCL Patienten präsentieren sich bei Erstdiagnose bereits mit einer disseminierten Erkrankung und generalisierten Lymphadenopathie sowie mit Knochenmarksbefall. In einer Fallstudie von 80 Patienten lag bei 71% bereits das Ann Arbor Stadium IV vor mit, bei 14% das Stadium III. Extranodale Beteiligung bei Erstdiagnose ist sehr häufig, vor allem der Befall des Knochenmark, des peripheren Blutes und des Gastrointestinaltraktes. Weniger oft sind der Waldeyersche Rachenring, Leber oder andere Organe betroffen [47]. Splenomegalie liegt bei knapp der Hälfte der Patienten vor [48], während B-Symptome eher selten klinisch in Erscheinung treten [47]. Eine ZNS-Beteiligung im Verlauf der Erkrankung wurde bei 13% der Patienten beschrieben und präsentiert sich durch neurologische Symptome wie Fazialisparese oder Diplopie, stellt aber ein spätes Ereignis der Erkrankung dar [49].

Nachdem es für das MCL lange Zeit keinen eigenen Prognosescore gab, wurde 2008 der MCL spezifische prognostische Index MIPI (Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index) eingeführt. In diesen fließen Alter, Allgemeinzustand (ECOG), Leukozytenzahl und LDH ein und teilt die Patienten daran in eine Hochrisiko-, Intermedium- und Niedrigrisikogruppe ein [50]. Ein weiterer Risikofaktor ist eine hohe Proliferationsrate, welche über den Ki-67 Index erfasst werden kann [51]. Das Protein Ki-67 ist ein weithin etablierter Marker für Proliferation und wird seit vielen Jahren in der Pathologie eingesetzt [52]. Für das MCL gilt, je mehr Zellen positiv für Ki-67 sind, desto höher ist die Proliferationsrate und desto schlechter ist die Gesamtprognose [51]. Damit übereinstimmend zeigt der aggressivere blastoide Typ des MCL vermehrt positive

Zellen auf Ki-67 [53].

Der klinische Verlauf des MCL erscheint als aggressive Erkrankung, die von schneller Tumorprogression und häufigen Rezidiven trotz Chemotherapie geprägt ist und zu einer stark eingeschränkten Lebenserwartung führt [48], [54]. Dank besserer Therapieoptionen konnte sich dennoch das mediane Überleben in neueren Studien auf 5-7 Jahre verbessern und zeigt damit eine Verdoppelung in den letzten 30 Jahren [55]. Auch das progressionsfreie Überleben konnte durch Intensivierung der Erstlinientherapie auf 3,7 versus 1,6 Jahre verlängert werden, abgesehen von einer Stammzelltransplantation ist bislang jedoch keine kurative Therapie verfügbar [29]. In neueren Studien wurde allerdings eine Untergruppe von MCL-Patienten beschrieben, die sich selbst ohne Therapie mit indolentem Lymphknotenbefall und längerem Überleben präsentieren [56], [57].

### **1.1.6 Therapie**

Über die letzten Jahre und Jahrzehnte hat sich die Therapie des Mantelzelllymphoms schrittweise von einer Kombination verschiedener Chemotherapeutika über die Kombination zielgerichteter Substanzen und Immuntherapien entwickelt [58]. Für das MCL gibt es bisher keine einheitlichen Therapiestandards, da viele Faktoren wie Alter und Allgemeinzustand bei den Therapieentscheidungen berücksichtigt werden müssen. Viele Therapien erfolgen im Rahmen von Studien, im Folgenden werden nur einige aufgeführt und näher erläutert. Grob kann man junge und fitte Patienten sowie ältere Menschen mit schlechterem Allgemeinzustand voneinander abgrenzen. Auch unterscheidet sich die Therapie bei Rezidiven von der Erstlinientherapie [59].

Einige Patienten können zunächst von einem watch and wait profitieren. Unter anderem bei asymptomatischen Patienten mit einem guten ECOG und niedriger LDH kann auf eine sofortige Therapieeinleitung verzichtet werden, ohne damit langfristig ein schlechteres Outcome zu erreichen [60].

Jüngeren Patienten ohne schwere Nebenerkrankungen können im Allgemeinen intensivere Chemotherapien und aggressivere Medikamente vertragen und eignen sich daher häufiger für Stammzelltransplantation. Lange Zeit war das R-CHOP Regime der Standard für die Erstlinientherapie, welches den anti-CD20 Antikörper Rituximab mit den Zytostatika Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und dem Glukokortikoid Prednisolon kombinierte. Doch nach initial guten Ansprechquoten von 94% und kompletten Remissionen in 34%, kam es häufig und durchschnittlich schon nach 21 Monaten zu Rezidiven [61].

Dies führte zu dem Schluss, dass entweder eine Intensivierung der Erstlinientherapie oder eine Remissionserhaltung mit Hochdosistherapie (HDT) und folgender autologer Stammzelltransplantation (ASZT) von Nutzen sein könnte [59]. Einige Studien haben den Effekt von HDT/ASZT im Anschluss an die initiale Therapie untersucht und erzielten im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur mit Immunochemotherapie behandelt wurde, gute Ergebnisse. Es muss bei der Interpretation dieser Daten allerdings berücksichtigt werden, dass die meisten Patienten des HDT/ASZT Studienarmes jünger und im Allgemeinen gesünder waren als der durchschnittliche MCL-Patient [62], [63]. Aktuell stellt eine Immunochemotherapie mit folgender autologen Stammzelltransplantation bei jungen Patienten ohne Vortherapien die Therapie der Wahl dar. Die Effektivität einer autologen Stammzelltransplantation wurde durch die Hinzunahme von Hochdosis-Cytarabin (HiDAC) als Teil der Induktion nochmals verbessert. Die MCL-Younger-Studie des europäischen Mantelzelllymphom Netzwerkes stellte 6 Zyklen R-CHOP gefolgt von einer myeloablativen Radiochemotherapie und nachfolgender autologen SZT gegenüber 3 Zyklen R-CHOP und 3 Zyklen R-DHAP (Rituximab, Dexamethason, HiDAC und Cisplatin), gefolgt von einem myeloablativen Regime mit autologer SZT. Der Einschluss von Cytarabin führte vermehrt und früher zu kompletten Remissionen (CR: 25% vs. 36%) und weiterhin zu einer verlängerten Zeit bis zum Eintreten eines Therapieversagens (Progression, Tod) (46 vs. 88 Monate) [64]. In einer Langzeitauswertung aus dem Jahr 2016 zeigte sich nach einer medianen Nachbeobachtung von 6,1 Jahren, dass auch die Zeit bis zum Therapieversagen mit 9,1 Jahren vs. 3,9 Jahren in der Gruppe der Patienten, die eine Immunochemotherapie mit Cytarabin erhal-

ten hatten, signifikant länger ist [65]. Eine weitere Studie zeigte einen effektiven Nutzen einer Rituximab Erhaltungstherapie nach autologer SZT, nach vier Jahren konnte ein progressionsfreies Überleben in 83% der Fälle gesehen werden, verglichen mit 64% in der Kontrollgruppe. Auch das Gesamtüberleben lag in der Interventionsgruppe höher [66].

Aufgrund vermehrter und schwerwiegender Nebenerkrankungen sowie niedrigere Toleranzfähigkeit gegenüber ungewollten Arzneiwirkungen müssen Therapien für ältere Patienten oder Patienten mit eingeschränktem Allgemeinzustand dementsprechend angepasst sein. Die Standardtherapie für Patienten, welche nicht für eine Stammzelltransplantation in Frage kommen oder aufgrund anderer gesundheitlichen Probleme keine intensive Chemotherapie vertragen würden, ist die Kombination des Alkylanz Bendamustin mit Rituximab [58]. In einer randomisierten Studie wurde diese neuere Kombination dem klassischen R-CHOP Schema gegenübergestellt. Patienten, welche die Bendamustin-Rituximab Therapie erhielten, zeigten ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben (69,5 vs. 31,2 Monate) mit weniger Nebenwirkungen [67]. Auch die Hinzunahme von niedrigdosiertem Cytarabin zu Rituximab-Bendamustin zeigte sich als effektive Induktionstherapie mit einer Ansprechrate von 91%, jedoch mit höheren Raten an Thrombozytopenien [68]. In der LYM-3002 Studie konnte weiterhin ein signifikant längeres Überleben unter VR-CAP (Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Bortezomib, Prednisolon) verglichen zu R-CHOP bei kalkulierbarem Nebenwirkungsprofil aufgezeigt werden [69]. Auch weitere Substanzen wie Lenalidomid [58] können zur Therapie herangezogen werden, letztlich sollte immer anhand der klinischen Gesamtsituation eine individuelle Therapieentscheidung für den Patienten erfolgen.

Leider kommt es auch nach intensiver Therapie oder autologer Stammzelltransplantation in vielen Patienten im Laufe der Zeit zu einem Rezidiv der Erkrankung. In diesem Fall kommen molekulare Ansätze wie Bortezomib, Lenalidomid, Ibrutinib oder Temsirolimus zum Einsatz [58].

Der Proteasomeninhibitor Bortezomib zeigte gute Wirksamkeit und konnte das Überleben von Patienten mit therapierefraktärem oder rezidiviertem MCL ver-

längern [70]. Auch die Kombination mit Rituximab und Dexamethason lieferte vielversprechende Ergebnisse [71].

Lenalidomid weist als Analogon von Thalidomid immunmodulatorische Eigenschaften [72] auf und erreichte als Monotherapie eine Ansprechrate von 53% [73]. Auch hier zeigte die jeweilige Kombination von Lenalidomid mit Dexamethason [74] oder Rituximab [75] in klinischen Studien eine gute Wirksamkeit.

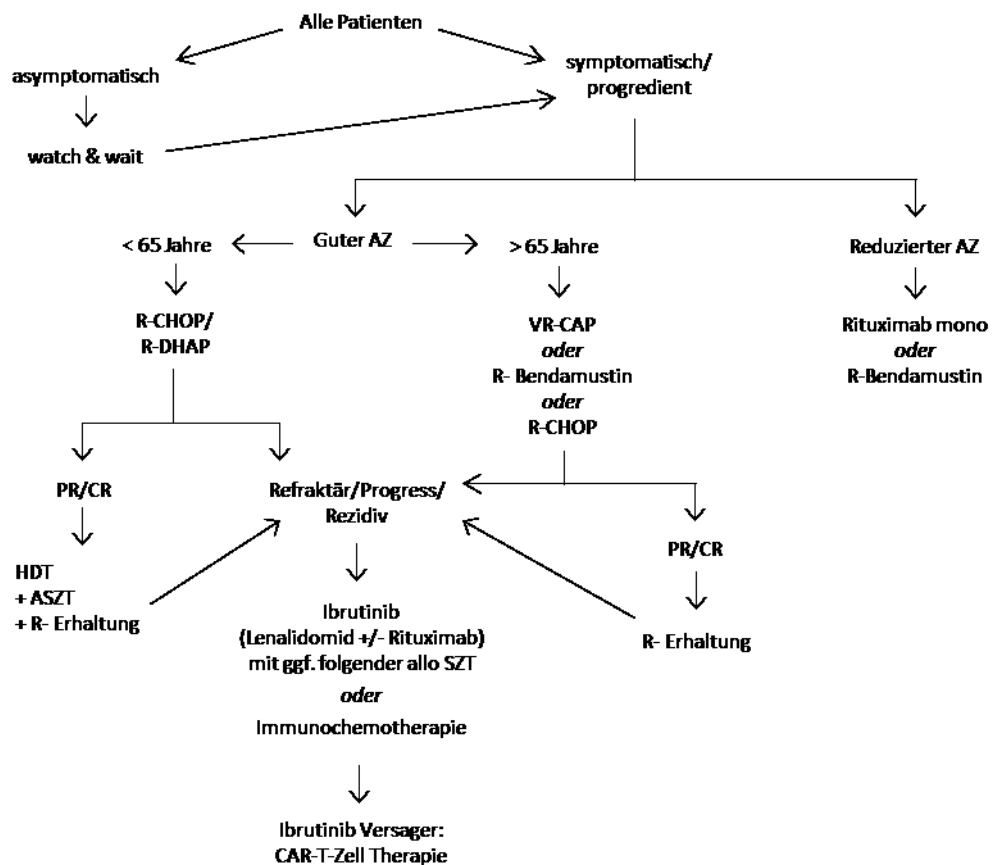
Ibrutinib ist ein Inhibitor der Bruton-Tyrosinkinase, welche essentiell für den B-Zell-Rezeptor Signalweg und die Aktivierung der B-Zellen ist [76]. Mit diesem konnten Ansprechraten von 68% erreicht werden, davon zeigten 21% eine komplette Remission [77].

In der Pathogenese des MCL spielt die konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt/mTor-Signalweges eine wichtige Rolle [78], Temsirolimus greift als Inhibitor des mTor hier an [79]. Die wöchentliche Monotherapie von 250mg Temsirolimus intravenös bedingte eine Ansprechrate von 38%, jedoch mit relativ häufigen hämatologischen Nebenwirkungen [80]. Daher wurde in einer weiteren Studie die Gabe auf 25mg wöchentlich reduziert, bei geringerer Toxizität konnten ähnliche Ansprechraten von 41% erreicht werden [81].

Weiterhin wurde nach bereits erfolgter autologer Stammzelltransplantation und folgendem Rezidiv des MCL auch die Möglichkeit einer allogenen Stammzelltransplantation geprüft. Hier konnte nach einem medianen progressionsfreien Überleben von 30,1 Monaten ein medianes Gesamtüberleben von 62 Monaten detektiert werden [82].

Aktuell wird ebenfalls der Effekt einer CAR-T-Zell-Therapie bei Patienten mit refraktärem oder rezidiviertem MCL untersucht [83], [84]. Bei vielversprechenden Ergebnissen läuft seit 2015 eine multizentrische Phase II Studie ZUMA-2, die die Ansprechraten einer einzelnen CAR-T-Zell Infusion nach Konditionierung mit Cyclophosphamid und Fludarabin untersucht. 2020 wurden im New England Journal of Medicine die ersten Ergebnisse veröffentlicht. Die primäre Effektivitätsanalyse zeigte in 93% der 60 Patienten ein objektivierbares Ansprechen,

eine komplette Remission konnte in 67% dokumentiert werden. Die Ansprechraten waren in den verschiedenen Subgruppen u.a. auch Patienten mit Hochrisikokonstellation ähnlich. Nach einer durchschnittlichen Nachbeobachtung von 12,3 Monaten waren noch 57% der 60 Patienten in Remission. Zu bemerken ist jedoch eine hohe Rate an therapieassoziierten Nebenwirkungen, welche auch schwerwiegende oder lebensbedrohliche Verläufe annehmen können. Neben Blutbildveränderungen und Infektionen sind hier vor allem das Zytokinfreisetzungssyndrom und neurologische Ereignisse zu nennen [85].



Nach [86]

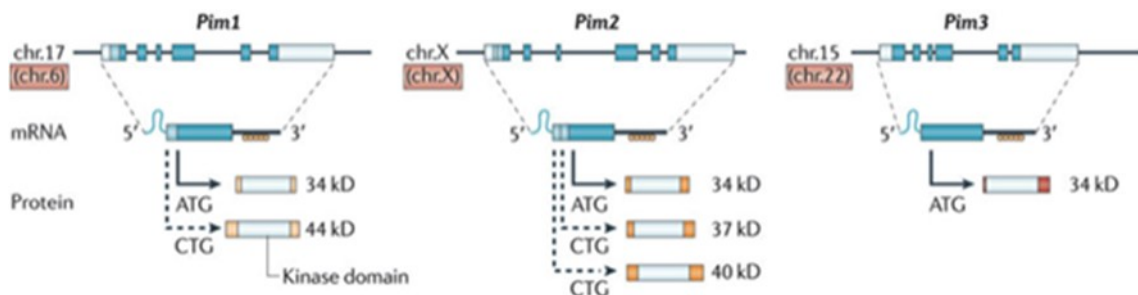
Abbildung 2: Therapiealgorithmus für das Mantelzelllymphom

Legende: R = Rituximab

## 1.2 Die PIM-Kinasen

### 1.2.1 Die PIM-Kinasen Familie

Die PIM- (proviral insertion in murine lymphoma) Proteine sind eine Familie von drei Serin/Threonin-Kinasen, genannt PIM-1, PIM-2 und PIM-3. Ursprünglich wurde der Genlocus von PIM-1 Mitte der 1980er Jahre als Integrierungsort des Moloney murinen Leukämievirus entdeckt [87]. Von PIM-1 existieren zwei unterschiedlich große Isoformen, ein 33kDa und ein 44kDa großes Protein, resultierend aus zwei alternativen Startcodons der mRNA [88], [89]. Auch für PIM-2 sind 3 Isoformen mit je 34kDa, 37kDa und 40kDa beschrieben, jedoch nur ein Protein für PIM-3 [90]. Die PIM-Kinasen Familie zeigt einen hohen Grad an Homologie zwischeneinander - 66% der Aminosäuren stimmen bei PIM-1 und PIM-3 überein, 55% bei PIM-1 und PIM-2 [91]. Zwischen humanem und murinem PIM-1 besteht eine 94% Übereinstimmung auf Aminosäuren-Ebene [92]. Durch diese große Similarität konnte auch eine hohe funktionelle Redundanz beobachtet werden, sowohl in vitro [93] als auch in vivo [94]. Bei Knockout von PIM-1 wird PIM-2 kompensatorisch hochreguliert, ebenso PIM-3 nach Verlust von PIM-1 und PIM-2 [95].



Quelle: [90]

Abbildung 3: Genloci, mRNA-Transkripte und Proteinisoformen der PIM-Kinase

Die Lokalisation der PIM-Gene unterscheidet sich zwischen dem murinen und humanem Genom (rot unterlegt). 6 Codons werden zur mRNA transkribiert, die orangenen Kreise am 3' Ende stellen 5 Kopien der destabilisierenden AUUUA-Sequenz dar. Der blaue Schwanz am 5' Ende der mRNA symbolisiert die GC-reiche Region die zur Regulation der Translation dient. Durch unterschiedliche Startcodons für die ribosomale Translation der mRNA können mehrere Isoformen gebildet werden, die sich in ihrer Größe unterscheiden, aber ihre Kinaseaktivität behalten [90].



PIM-Proteine sind konstitutiv aktive Kinasen und erfordern keine posttranslationale Modifikation um ihre Kinase-Aktivität zu induzieren. Ihre Aktivität wird daher vor allem über ihre Transkription und Translation reguliert [96]. Die Transkription der *PIM*-Gene wird nach Stimulation von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie Interleukin-2, -12, -15 und Interferon- $\gamma$  von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und Signalwegen wie der *Janus Kinase signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT) Signalweg aktiviert [97], [98]. Nach Zytokinbindung an ihren Rezeptor phosphoryliert und aktiviert JAK die STAT-Proteine, diese werden dann in den Nukleus transportiert und dienen dort als Transkriptionsfaktoren der *PIM*-Gene [99]. Via STAT5 sind sie darüber hinaus nachgeschaltete Effektorproteine von den bekannten Onkoproteinen Abelson (ABL) [100] und Flt3 [101]. Hypoxie in soliden Tumoren kann unabhängig von dem Hypoxie-induzierten Faktor (HIF)  $\alpha$  die Expression von *PIM-1* triggern [102], [103], ebenso wie DNA-Schäden, bei welchen die Aktivierung der Proteinbiosynthese über den Transkriptionsfaktor Krüppel-like Faktor 5 (KLF 5) läuft [104]. Auch einige Medikamente können die Genexpression der PIM-Familie induzieren. So kommt es zum Beispiel unter Behandlung mit Vorinostat zu vermehrter Expression von *PIM-1* und *PIM-2* [105], ebenso kann Docetaxel die Aktivität von STAT3 in Prostatakarzinomzellen hochregulieren, in der Folge wird PIM-1 vermehrt exprimiert [106].

Aufgrund von mehreren Kopien der destabilisierenden AUUU(A) Sequenz in dem 3' untranslatiertem Bereich (UTR) haben die entstehenden PIM-mRNAs nur eine geringe Halbwertszeit [94]. Regulation der Translation erfolgt über eine lange GC-reiche Region am 5' UTR, die zu einer Hemmung dieser führt. Es konnte jedoch eine Zunahme der Translation nach Beseitigung dieser Sequenz beobachtet werden, ebenso bei Überexpression des Translations-Initiationsfaktor eIF4E [107]. Letztlich wird ein Großteil der Aktivitätskontrolle über die Stabilität der Proteine erreicht. Proteasomaler Abbau erfolgt über Bindung von PIM-1 und PIM-3 an die Serin/Threonin Protein Phosphatase 2A (PP2A) und folgender Ubiquitinierung [108]. Durch Bindung an das Hitzeschock Protein (Hsp) 90 werden die PIM-Proteine vor dem proteasomalem Abbau geschützt, Bindung an das Hsp70 führt jedoch zu einem verstärkten Abbau [109].

PIM-Proteine werden in geringem Maße in praktisch allen Geweben exprimiert, sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Verteilung. PIM-1 wird während der fetalen Hämatopoese in hohem Maße in Leber und Milz gebildet, dies nimmt mit zunehmendem Alter nach Geburt ab [110]. Die Expression von PIM-1 und PIM-2 erfolgt gleichermaßen in den lymphatischen Organen und Knochenmark, PIM-1 wird darüber hinaus überwiegend in Hoden und Thymus, PIM-2 hingegen vor allem in Gehirngewebe exprimiert [111]. PIM-3 findet man hauptsächlich in Herz-, Lungen- und Nierengewebe sowie im Hirnstamm [112].

### 1.2.2 Physiologische Funktion

PIM-Kinasen sind an vielen wichtigen Signalwegen und Zellfunktionen beteiligt, vor allem aber an der Zellproliferation, Apoptose und Zellzyklus (Abb. 4). Sie üben ihre Funktion über die Phosphorylierung zahlreicher zellulärer Substrate aus und zeigen untereinander eine hohe funktionelle Redundanz [93], [94]. Interessanterweise überschneiden sich die Substrate stark mit denen der Proteinkinase B (Akt) [113], deren Signalweg in einem folgenden Kapitel näher erläutert wird.

PIM-Kinasen nehmen Einfluss auf den Zellzyklus durch verschiedene Mechanismen. Es konnte gezeigt werden, dass PIM-1 die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) 2 erhöht und somit den Übergang von der G1 zur S-Phase beschleunigt. Weiterhin binden und phosphorylieren alle drei PIM-Kinasen den CDK-Inhibitor  $p27^{Kip1}$  [114], der durch die Regulation des Überganges von der G1 zur S-Phase eine wichtige Rolle in der Tumorsuppression und Hemmung des Zellzyklus spielt [115]. Phosphorylierung dessen bewirkt seine Bindung an die 14-3-3 Proteine, es folgen die Translokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma und der proteasomale Abbau. Außerdem wird die Transkription von  $p27^{Kip1}$  durch die Phosphorylierung und damit Inaktivierung der Transkriptionsfaktoren FoxO1a und FoxO3a gehemmt. PIM-Kinasen führen also letztlich zu einer Reduktion von  $p27^{Kip1}$  und fördern so die Zellproliferation und Tumorgenese [114]. PIM-1 phosphoryliert zudem den CDK Inhibitor

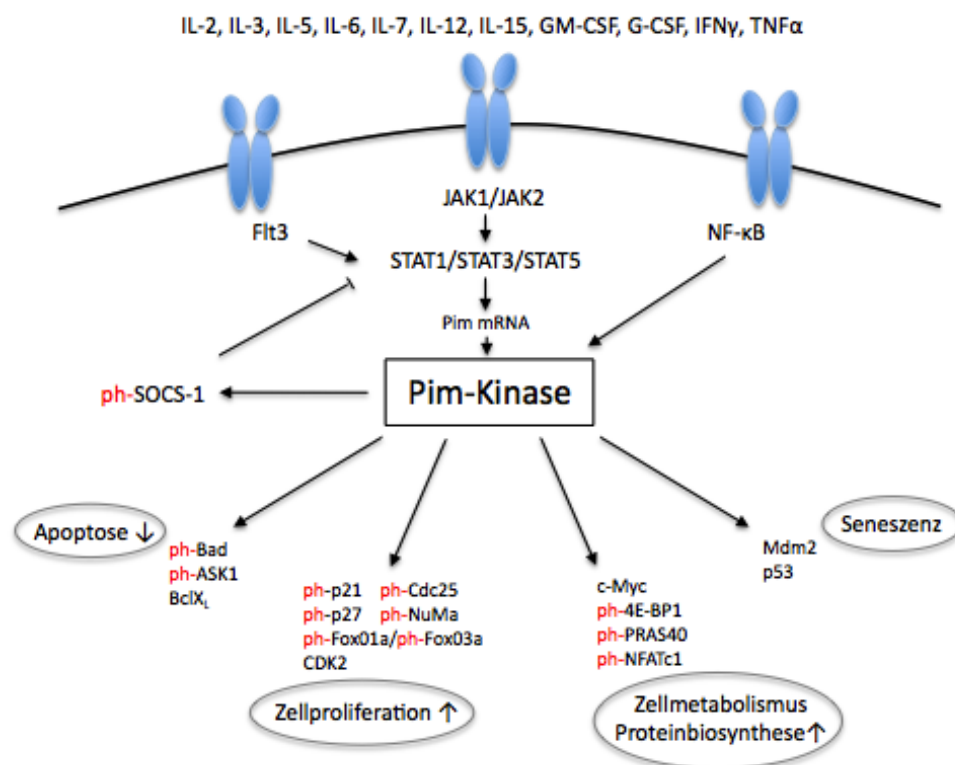
p21<sup>Cip1/WAF1</sup> an Threonin (Thr) 145 [116], welcher dadurch aus dem Zellkern in das Zytoplasma transloziert wird. Studien konnten aufzeigen, dass ein erhöhtes Vorkommen von phosphoryliertem p21 im Zytoplasma mit einem schlechteren Überleben bei Krebspatienten verbunden ist [117]. PIM-1 beeinflusst weiterhin die Phasen des Zellzyklus indem wichtige Tyrosinphosphatasen phosphoryliert werden, darunter z.B. Cdc25A, die die Übergänge der verschiedenen Zellzyklusphasen regulieren [118]. Ebenso wird von PIM-1 das Nuclear Mitotic apparatus protein (NuMa) phosphoryliert und damit stabilisiert, welches für die Bildung des Spindelapparates während der Mitose erforderlich ist [119].

Ihren anti-apoptotischen Effekt üben die PIM-Kinasen unter anderem über die Phosphorylierung des Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death (Bad) an Serin 112 aus. Unphosphoryliertes Bad bindet und inaktiviert dadurch anti-apoptotische Proteine der Bcl-2 Familie, durch Phosphorylierung von Bad lösen sich diese und können ihre anti-apoptotische Wirkung verstärkt ausüben [120]. PIM-3 hat weiterhin einen positiven Effekt auf die Transkription und Translation des anti-apoptotischen Bcl-X<sub>L</sub> Proteins [121]. Ein weiterer wichtiger Mechanismus der zu vermehrtem Zellüberleben führt ist die Phosphorylierung der Apoptosis signaling Kinase 1 (ASK1) an Ser83 durch PIM-1. Dies führt zu verringerter Kinase-Aktivität, ihre Substrate werden weniger phosphoryliert bis letztlich die Aktivierung der Caspase 3 und damit die Apoptoseeinleitung verhindert wird [122].

PIM-Kinasen tragen auch zu erhöhter Stoffwechselaktivität bei. Sowohl PIM-1 als auch PIM-2 phosphorylieren 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1), einen wichtigen Regulator der Protein Translation, der unphosphoryliert eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) bindet und inaktiviert. Durch diese Modifikation lösen sich die beiden Proteine und eine vermehrte Translation findet statt [123], [124]. PIM-1 arbeitet außerdem mit dem Transkriptionsfaktor c-Myc zusammen und ist an der Regulation von etwa 20% der von c-Myc regulierten Gene beteiligt. PIM-1 bindet mit c-Myc und MAX (Myc-associated factor X), phosphoryliert in diesem Komplex Histon 3 an Ser10 und verstärkt so die Transkription verschiedener von c-Myc kontrollierter Gene [125]. Auch der Transkriptionsfaktor NFATc1 (Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1)

der NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) - Familie wurde als Substrate der PIM-1 Kinase identifiziert. Durch Phosphorylierung wird seine Transkriptionsaktivität erhöht, die Zelle produziert vermehrt IL-2 und fördert so die Proliferation [126].

Ein weiteres Substrat von PIM-1 ist PRAS40. Dieses Protein bindet an mTor und verringert so dessen enzymatische Aktivität, welche an vielen zellulären Stoffwechselwegen wie Zellwachstum, Proteintranskription und -translation sowie am Zellzyklus beteiligt ist [127]. Wird PRAS40 von PIM-1 an Thr246 phosphoryliert, löst sich die Bindung und mTor kann seine volle Wirkung ausüben [123].



nach [128]

Abbildung 4: Regulierung der PIM-Kinasen Proteinbiosynthese und ihre nachgeschalteten Substratproteine

Die meisten Substrate werden von den PIM-Kinasen phosphoryliert und somit in ihrer Aktivität beeinflusst. Die Kinasen können aber auch z.B. durch Stabilisierung oder Verhinderung des Abbaus Einfluss auf ihre Zielproteine nehmen.

Wie bereits erwähnt, wird die Transkription der PIM-mRNA durch den JAK-STAT Signalweg reguliert. Ein wichtiger Inhibitor dieses Stoffwechselweges ist der Suppressor of Cytokine Signalling (SOCS) 1 [129], [130], der ein weiteres Substrat der PIM-Kinasen darstellt. Durch Phosphorylierung wird das Protein stabilisiert und sein Abbau verhindert, die Inhibition der JAK-STAT Aktivierung nimmt also zu. Durch diesen negativen Feedback-Mechanismus nehmen die PIM-Kinasen selbst Einfluss auf ihre Aktivierung [131], [132].

Auch der p53 Inhibitor Mdm2 wird von PIM-1 an Ser166 und Ser186 phosphoryliert und stabilisiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass PIM-1 als Onkogen über Mdm2 zu einer Verringerung der p53 Proteinlevel führt. Überraschenderweise ist aber genau das Gegenteil der Fall. In einigen Zelllinien mit pathologisch erhöhten Proteinspiegeln der PIM-1 Kinase konnte gleichzeitig erhöhtes p53 bestimmt werden. PIM-1 und PIM-2 verhindert den Abbau sowohl von Mdm2 als auch von p53, unabhängig von der Phosphorylierung von Mdm2. Diese Vorgänge können die in primären Zellen beobachtete Seneszenz erklären. In diesem Fall verhält sich die PIM-Kinasen wie Onkogene im klassischen Sinne, welche zu Induktion von p53, p21 und SA(senescence-associated)- $\beta$ -Galactosidase führen - Marker, die typisch für das Einsetzen zellulärer Seneszenz sind [133].

### **1.2.3 PIM-Kinasen und maligne Tumore**

Erhöhte Proteinlevel von PIM-1 wurden zuerst in lymphatischen und myeloiden Leukämien [110] und Lymphomen [134] nachgewiesen. Auch im MCL konnte dies bestätigt werden [135], in einer Studie wurden von 33 Gewebeproben 14 (42%) positiv auf eine verstärkte PIM-Expression getestet [133]. Bei AML-Patientenproben zeigten 28% eine pathologische Erhöhung von PIM-1/-2/-3, dies korrelierte mit einer schlechteren Überlebensprognose [91]. Zunehmend wird PIM-1 auch in soliden Tumoren gefunden. So wurde eine Überexpression von PIM-1 u.a. in pankreatischen epithelialen Neoplasien [136], im Magenkarzinom [137], Harnblasenkarzinom [138] und myxoidem Liposarkom [139] gefun-

den. In der Literatur mehrfach beschrieben ist auch das Vorkommen von PIM-1 im Prostatakarzinom [140], [141].

Eine vermehrte Expression von PIM-2 konnte bisher u.a. für das folliculäre Lymphom (FL), diffus großzellige B-Zelllymphom (DLBCL), B-CLL [142], AML [143] sowie für das Prostatakarzinom [144] aufgezeigt werden. Auch abnormale Proteinlevel von PIM-3 konnten in einigen malignen Tumoren nachgewiesen werden, vor allem in Organen, die in der Embryonalentwicklung aus dem Entoderm stammen. So kann PIM-3 zwar nicht in gesundem Leber- [145] oder Pankreasgewebe [121] nachgewiesen werden, dafür aber in Biopsien maligner Läsionen dieser Organe. Weiterhin kann PIM-3 nicht in gesundem Kolonepithel oder schlecht differenziertem Kolonkarzinom detektiert werden, jedoch in Kolonadenomen sowie in gut und mäßig differenziertem Kolonkarzinom [146]. Ebenso wurden Magenadenome und weniger häufig auch Magenkarzinome positiv auf PIM-3 getestet, darüber hinaus deren Metastasen, die interessanterweise sogar eine stärkere Expression von PIM-3 zeigten als die Primärtumore [147].

Ebenso trägt die in Tumorzellen verlängerte Halbwertszeit des PIM-1 Proteins zu den erhöhten Proteinspiegeln bei. In gesunden mononukleären Zellen des peripheren Blutes betrug diese nur etwa 5 Minute [148], in Tumorzellen konnte hingegen eine Halbwertszeit von über 100 Minuten gemessen werden [109].

Die pro-onkogenetische Aktivität der PIM-Kinasen wurde in einem Modell mit transgenen Mäusen untersucht. In diesen führte eine Immunglobulin-Enhancer-Sequenz ( $E\mu$ ) vor dem *PIM*-Gen zu erhöhter PIM-1 Proteinkonzentration in B- und T-Zellen, jedoch entwickelten nur 5-10% der Mäuse T-Zell Lymphome. Diese Ergebnisse suggerieren, dass PIM-1 alleine nicht in der Lage ist eine massive Zellproliferation zu bewirken [149]. Wurden diese transgenen Mäuse allerdings postnatal mit dem murinen Leukämievirus infiziert, konnte eine starke Zunahme der Tumorinzidenz als auch eine kürzere Latenzzeit bis zum Auftreten dieser beobachtet werden [149]. In allen Tumoren konnte eine Beteiligung von c-Myc oder N-Myc festgestellt werden, was ein Zusammenspiel von Myc und *PIM-1* Genen bei der Lymphomentstehung nahelegt. Dieser Verdacht wurde bestätigt, nachdem zweifach transgene Mäuse mit  $E\mu$ -PIM-1 und  $E\mu$ -Myc

nicht lebensfähig waren und oftmals schon in utero an Lymphomen erlagen [150]. In einem weiteren Versuch konnten diese Beobachtungen für alle PIM-Kinasen bestätigt werden. In Mäusen führte die jeweilige Koexpression aller 3 PIM-Kinasen mit Myc zu einer erheblich beschleunigten und tödlichen Genese von myeloischen Leukämien. Diese Tiere erlagen ihren Erkrankungen nach durchschnittlich 25 (PIM-1) bis 42 (PIM-3) Tagen, während nach 130 Tagen nur 50% der Mäuse starben, die lediglich Myc überexprimierten [91]. Man nimmt an, dass erhöhtes Myc eine apoptotische Reaktion in der Zelle auslöst, die zur Tumorentstehung überwand werden muss. PIM-Kinasen können diesen Mechanismus durch Phosphorylierung von Bad gegenregulieren und somit die zelluläre proapoptotische Antwort verringern [124]. Im Prostatakarzinom geht die gleichzeitige Überexpression von PIM-1 und Myc, die in einer Studie bei 45% der Patienten vorlag, mit einem höheren Gleason-Score einher [141].

Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend konnte die alleinige Überexpression von PIM-1 in der benignen Prostata-Zelllinie RWPE1 eine erhöhte Proliferationsrate bewirken, jedoch keine maligne Transformation der Zellen [151]. Indem die PIM-Kinasen gezielt kanzerogene Fähigkeiten der Zellen stärken, stellen sie damit schwache Onkogene dar [152].

Erwähnenswert ist außerdem die Tatsache, dass erhöhte Proteinlevel von PIM-1 zu genomischer Instabilität führen. Sie umgehen die Kontrollpunkte des Zellzyklus und ermöglichen so DNA-Replikation ohne Zellteilung, welches dann zu Polyploidie führt. Diese Zellen zeigten außerdem einen abnormalen Spindelapparat sowie inkorrekte Chromosomen Teilung. Zusammen führte dies zu einer fehlerhaften oder verzögerten Zytokinese, was zu der Annahme führt, dass PIM-1 durch genomische Instabilität eine wichtige Rolle in der frühen Tumorgenese spielt [153].

#### **1.2.4 PIM-Kinasen Inhibitoren**

Inhibitoren der PIM-Kinasen eignen sich gut als Therapeutika gegen maligne Tumoren, da sie in vielen hämatologischen und soliden Tumoren abnormal

stark exprimiert werden und zudem an vielen krebstypischen Signalwegen wie Zellproliferation, Apoptose und Zellzyklusregulation beteiligt sind [154]. Mittlerweile wurden über hundert PIM-Kinase Inhibitoren unterschiedlicher Klassen entwickelt [152]. Die meisten sind gegen alle drei PIM-Kinasen wirksam, jedoch mit größter Affinität zu PIM-1 [155], [156]. Aufgrund ihrer bereits erwähnten funktionellen Redundanz kann das gleichzeitige Targeting aller PIM-Kinasen einen Vorteil bei der Krebstherapie darstellen [154]. Der IC50 dieser Substanzen liegt in vitro zumeist im niedrigen nanomolaren Bereich [152]. Wie Mikkers et al. in einer Studie mit *PIM*-knock-out Mäusen zeigen konnte, wären bei Pan-PIM-Inhibitoren voraussichtlich keine schweren Nebeneffekte der Therapie zu befürchten. Tiere, bei denen alle drei Isoformen der PIM-Kinasen fehlten, waren fruchtbar und zeigten eine normale Lebenserwartung. Es konnte jedoch eine Verringerung der Körpergröße sowie die Zunahme des MCV der Erythrozyten festgestellt werden. Außerdem zeigten hämatopoetische Stammzellen eine beeinträchtigte Antwort auf Wachstumsfaktoren in vitro [94]. Dies alles spricht dafür, dass PIM-Kinasen zwar eine wichtige, aber auch entbehrliche Rolle im Organismus spielen und lassen damit eine gute Verträglichkeit von Pan-PIM-Inhibitoren erwarten [94].

Therapie mit PIM-Kinase Inhibitoren kann überdies dazu beitragen, die von PIM-Kinasen geförderte Medikamenten Resistenz, die unter anderem über die Inaktivierung von Bad erfolgt, zu überwinden [154]. Auch die durch rasches Tumorwachstum entstehende Hypoxie spielt hierbei eine wichtige Rolle. Erleben solide Tumoren Hypoxie, werden Stoffwechselwege aktiviert, die zu einem verbesserten Zellüberleben führen, darunter die vermehrte Expression von PIM-1. Hypoxie führt gegenüber Normoxie einerseits zu vermehrter PIM-Proteinbiosynthese, andererseits wird der Abbau von bestehendem PIM-1 verhindert. Die PIM-Kinasen wirken dann entsprechend positiv auf das Zellüberleben. Wird die Wirkung von PIM-1 allerdings durch siRNAs blockiert, sensibilisiert dies die Tumorzellen wieder auf den Glukosemangel unter Hypoxie. Durch PIM-Kinase Inhibitoren kann dieser Überlebensweg also gestoppt werden [102]. Weiterhin trägt die Inhibition der PIM-Kinasen zu einer Reduktion der zellulären Motilität und Invasion bei, wie Versuche mit der Prostata-



karzinomzelllinie PC3 mit dem spezifischen pan-PIM-Inhibitor DHPCC-9 demonstrierten [157]. Durch siRNA gegen PIM-3 konnte eine Abnahme der Proliferation, Migration und Streuung von Endothelzellen erreicht werden [158]. Diese Daten stützen die Annahme, dass PIM-Kinasen zur Neovaskularisation [158] und Metastasierung [152] von Tumoren beitragen.

Wie erwähnt, wurden bereits viele PIM-Inhibitoren entwickelt und in der Grundlagenforschung eingesetzt. Beispielhaft werden im Folgenden nur wenige näher erläutert.

Einer der ersten entwickelten PIM-Kinase Inhibitoren ist SGI-1776, ein Imidazopyridazin mit Aktivität an allen 3 PIM-Kinasen, aber auch mit signifikanter Aktivität an anderen Tyrosinkinase wie dem Zytokinrezeptor Flt3. In Zelllinien und primären Zellen verschiedener hämatologischer Tumoren zeigte sich eine sehr gute Wirkung, gemessen anhand der Abnahme der Phosphorylierung von PIM-Zielproteinen und Induktion von Apoptose [159], [160], [161]. Nachteil dieser Substanz ist die fehlende Selektivität, die es erschwert den tatsächlichen Beitrag der PIM-Inhibition an den beobachteten Effekten zu messen. Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurde eine Phase 1 klinische Studie begonnen, die Patienten mit therapierefraktärem Prostatakarzinom und rezidivierten Leukämien einschloss. Aufgrund kardialer Toxizität und erheblicher Verlängerung der QT-Zeit musste diese Studie jedoch vorzeitig abgebrochen werden [162]. Zurückführen lassen sich diese Nebeneffekte wohl auf die Inhibition von PIM-1, das im Zusammenspiel mit Akt eine kardioprotektive Wirkung vorweist [163].

Angesichts dieser Ergebnisse zielte die Entwicklung der nächsten Generation von PIM-Inhibitoren auf eine verbesserte Spezifität und eine verringerte Kardiotoxizität ab. Der PIM-Inhibitor SMI4a induzierte einen G1-Arrest und zeigte im Mausmodell eine Reduktion des Tumorwachstums ohne auffallende Toxizität [164]. Der spezifische pan-PIM-Inhibitor LGB321 bewirkte in Zelllinien aus hämatologischen Erkrankungen eine Hemmung der Zellproliferation und Phosphorylierung von Bad. In Zelllinien aus soliden Tumoren war dagegen nur eine begrenzte Wirksamkeit zu beobachten [165].

Der in dieser Arbeit verwendete pan-PIM-Inhibitor AZD1208 ist hoch selektiv für die PIM-Kinasen Familie und zeigte in in-vitro Versuchen einen Zellzyklusarrest, Apoptoseinduktion sowie eine dosis-abhängige Reduktion der Phosphorylierung von Zielsubstraten [166].

## 1.3 Der PI3K/Akt/mTor-Signalweg

### 1.3.1 PI3K/Akt/mTor

Zellen reagieren auf Veränderungen ihrer lokalen Umgebung mit Modifikationen in ihren zellulären Abläufen. Der PI3K/Akt/mTor-Signalweg ist ein zentraler Mechanismus, der das Zellwachstum, Proliferation und Zellüberleben an die zur Verfügung stehenden Wachstumsfaktoren, Nährstoffe und Energie anpasst [167].

In Säugetieren gibt es acht Isoformen der PI3K, unterteilt in Klasse IA, IB, II und III, die sich in Substratselektivität und der Art der Regulation unterscheiden. Jedoch sind nur Kinasen der Klasse I in der Lage das wichtige Signalmolekül Phosphatidylinositide-3,4,5-triphosphat ( $PIP_3$ ) zu bilden. PI3Ks der Klasse IA sind Heterodimere aus einer katalytischen Einheit p110 und einer regulatorischen Einheit (p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$ , p85 $\beta$  oder p55 $\gamma$ ). p110 kann wiederum als p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  oder p110 $\delta$  vorliegen [168]. Während p110 $\alpha$  und p110 $\beta$  nahezu ubiquitär exprimiert werden, findet man p110 $\delta$  hauptsächlich in Lymphozyten [169]. Von der Klasse IB gibt es nur ein Enzym, p110 $\gamma$ , welches zusammen mit seiner regulatorischen Untereinheit p101 die sogenannte PI3K $\gamma$  bildet [168].

PI3K ist mit vielen Zytokinrezeptoren, Rezeptortyrosinkinasen und dem B-Zell-Rezeptor [170], [171] verbunden und bildet bei Aktivierung durch Ligandenbindung den second messenger  $PIP_3$ . Dieser rekrutiert die Proteinkinase B (Akt) und die Phosphoinositide-abhängige Kinase (PDK) 1 an die Zellmembran. Eine negative Kontrolle der  $PIP_3$  Bildung erfolgt über die PTEN (Phosphatase

and Tensin homolog), welches Phosphatgruppen von  $PIP_3$  wieder abspalten kann. Zur Aktivierung von Akt ist die Phosphorylierung an Thr308 durch die PDK1 erforderlich [172], um die maximale Aktivität zu erreichen ist jedoch auch die Phosphorylierung an Ser473 nötig [173].

Die Serin/Threonin Kinase Akt nimmt als zentrales Enzym des Signalweges auf zahlreiche Substrate Einfluss und kann so Apoptose, Proliferation und Zellwachstum beeinflussen [174]. Im Folgenden werden nur die wichtigsten Mechanismen näher erläutert.

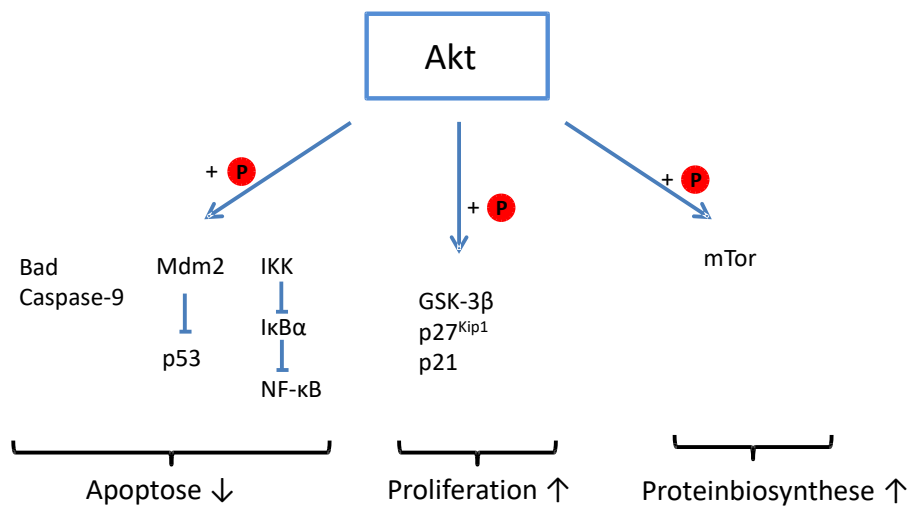
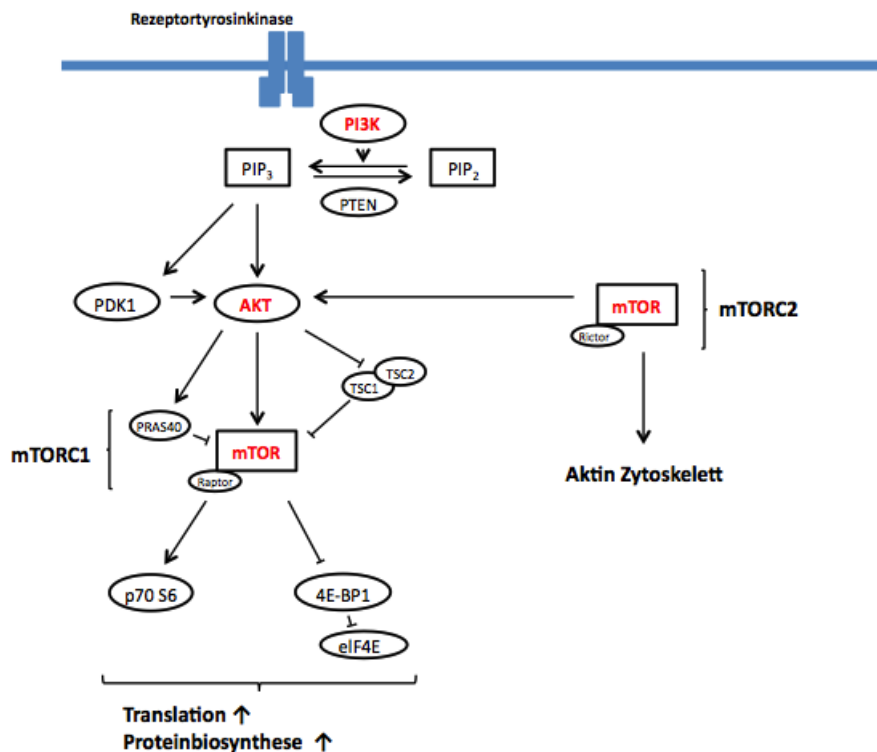


Abbildung 5: Die Kinase Akt und ihre Substrate

Ein antiapoptotischer Effekt wird durch die Phosphorylierung von u.a. Bad [175] und Caspase-9 [176] verursacht. Ebenso bewirkt die Phosphorylierung von Mdm2 einen erhöhten Abbau des pro-apoptotischen p53 [177]. Akt kann auch indirekt Einfluss auf das Zellüberleben nehmen. Durch Phosphorylierung aktiviert Akt den IκBα-Kinase-Komplex (IKK), der dadurch verstärkt die auf NF-κB hemmend wirkenden IκBα-Proteine phosphoryliert und deren Abbau einleitet. So kann NF-κB verstärkt seine antiapoptotische und proliferationsfördernde Wirkung ausüben [178].

Der Zellzyklus wird ebenfalls über verschiedene Mechanismen positiv beeinflusst. Die Glykogensynthase-Kinase (GSK) 3 $\beta$  reguliert die Cyclin D1 Spiegel, indem sie durch Phosphorylierung einen verstärkten Abbau verursacht [179]. Akt inhibiert die GSK-3 $\beta$  durch Phosphorylierung an Ser9 [180], sodass sich vermehrt Cyclin D1 anhäufen kann. Weiterhin werden CDK-Inhibitoren wie p27<sup>Kip1</sup> [181] und p21 [182] negativ beeinflusst.



nach [183]

Abbildung 6: Das Signalnetzwerk um mTor.

Pfeile entsprechen einer Aktivierung, Pfeile mit Querstrich einer Hemmung des folgenden Substrates.

Ein weiteres direktes Substrat von Akt ist mTor [184], ein zentrales Enzym des Zellwachstums, welches die Proteinbiosynthese nach Abhängigkeit von Nährstoffen reguliert [174]. Neben weiteren Proteinen bildet die mTor Kinase zusammen mit Raptor [185] bzw. Rictor [186] die beiden funktionell unterschiedlichen Komplexe mTORC1 bzw. mTORC2. Dabei wird nur mTORC1 von Rapamycin

gehemmt [187]. Funktionell liegt die Rolle des mTORC2 in der Regulierung des Aktin-Zytoskelettes [186] sowie in der Regulierung der Akt-Kinase durch Phosphorylierung an Ser473 [188]. Die beiden wichtigsten Substrate des mTORC1 stellen 4E-BP1 und p70 S6 Kinase dar, zwei Regulatoren der Translation, die direkte Substrate von mTor sind [189], [190]. Durch ihre Modifikation kommt es schließlich zu einer Verstärkung der mRNA-Translation [189]. Über die Aktivierung von PRAS40 übt Akt eine negative Kontrolle auf die Wirkung von mTor aus [191]. TSC1-TSC2 stellen einen weiteren physiologischen Inhibitor des mTor dar. Sie selber werden wiederum durch Akt-vermittelte Phosphorylierung gehemmt [192].

### **1.3.2 Dysregulation des PI3K/Akt/mTor-Signalweg in Tumoren und MCL**

An dem PI3K/Akt/mTor-Signalweg sind unterschiedliche Proteine beteiligt, deren Gene sich in einer Vielzahl von Tumoren als verändert gezeigt haben [174].

Häufig und in zahlreichen unterschiedlichen Tumoren wurden Mutationen und folglich Inaktivierung des *PTEN* festgestellt [193], darunter auch in Non-Hodgkin Lymphomen [194] und in etwa 15% der MCL [195]. Mäuse mit *PTEN*-defizienten B-Zellen zeigten eine erhöhte Menge an phosphoryliertem Akt, welches unter Therapie mit einem PI3K-Inhibitor vollständig aufgehoben wurde [196]. Die spontane Bildung von verschiedensten Tumoren u.a. T-Zell-Lymphome wurde in Mäusen, die heterozygot im *PTEN* Gen waren, beobachtet [197], [198].

Amplifikationen des *PIK3CA* Gens, das für die katalytische Untereinheit  $\alpha$  der PI3K codiert, wurden für die beiden MCL-Zelllinien Granta-519 und Rec-1 sowie für primäre Zellen des MCL beschrieben. Damit verbunden war eine erhöhte Aktivität des PI3K/Akt Signalweges [195]. Auch Mino, Jeko-1 und Z-138 zeigten einen aktivierten Akt/mTor-Signalweg [199]. Weitere Gene, die im Zusammen-

hang mit dem PI3K/Akt-Signalweg stehen, waren ebenso im Vergleich zu naiven B-Zellen hochreguliert [44]. Häufiger ist eine Steigerung der Aktivität von PI3K/Akt/mTor in der blastoiden Variante des MCL zu beobachten [78]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PI3K/Akt/mTor die Proliferation in MCL-Zelllinien antreibt [42].

### **1.3.3 Pharmakologische Inhibition des PI3K/Akt/mTor-**

#### **Signalweg**

Ein möglicher Angriffspunkt zur pharmakologischen Hemmung des PI3K/Akt/mTor Signalweg ist die PI3K. Es gibt sowohl pan-PI3K als auch Isoform-spezifische Inhibitoren, die alle an der ATP-Bindetasche angreifen. Wortmannin [200] und LY294002 [201] stellen mit die ersten bekannten PI3K-Inhibitoren dar, waren aber wenig selektiv für die PI3K. Minimale Unterschiede der ATP-Bindetasche hat man sich zu Nutze gemacht um PI3K-Inhibitoren zu entwickeln, die spezifisch für bestimmte Isoformen der PI3K sind [202].

Idelalisib (früher auch CAL-101) ist ein selektiver p110 $\delta$  Inhibitor der PI3K mit guter Aktivität gegen B-Zell Erkrankungen, darunter B-ALL, CLL und MCL [203]. In einer klinischen Studie mit therapierefraktären/rezidierten CLL-Patienten zeigte sich eine Ansprechrate von 72% ohne die für eine pan-PI3K-Inhibition typischen metabolischen Nebenwirkungen [204], [205]. In Kombination mit Rituximab zeigte sich eine verlängerte Zeit des progressionsfreien Überleben sowie des Gesamtüberlebens gegenüber Monotherapie mit Rituximab in Patienten mit rezidivierter CLL [206]. Ebenso ist Idelalisib in Patienten mit indolentem NHL wirksam [207]. Seit 2014 ist Idelalisib daher in der Zweitlinientherapie der CLL und des folliculären Lymphoms zugelassen [208].

mTor erhielt seinen Namen „mammalian Target of Rapamycin“ aufgrund der Inhibition durch das Makrolidantibiotikum Rapamycin [209]. Temsirolimus und Everolimus sind Analoga von Rapamycin, auch Rapaloga genannt, mit besseren chemischen Eigenschaften. Sie bilden zusammen mit FKBP12 einen

Komplex, der an die FRB-Struktur von mTor bindet und dadurch Hemmung von mTORC1 bewirkt [183]. Zunächst wurde Rapamycin als Immunsuppressiva eingesetzt [210], doch nachfolgende Studien belegten darüber hinaus zytostatische Eigenschaften, indem es das Zellwachstum u.a. von Pankreaskarzinomzelllinien [211] und B-Zell-Lymphom-Zelllinien [212] hemmte. Studien konnten einen positiven Effekt von Temsirolimus in MCL zeigen [80], [81], sodass es heute in Europa für das refraktäre und rezidierte MCL zugelassen ist [213]. Darüber hinaus findet Temsirolimus auch Anwendung in der Therapie des Nierenzellkarzinoms [214].

In letzter Zeit wurde eine neue Generation von mTor-Inhibitoren, die sowohl mTORC1 als auch mTORC2 hemmen, entwickelt [215]. Da mTORC2 Akt positiv reguliert, kann dadurch die Feedback Aktivierung von PI3K verringert werden [183].

## 2. Das Ziel dieser Arbeit

Das Mantelzelllymphom präsentiert sich in den meisten Fällen erst in fortgeschrittenem Krankheitsstadium und mit rasch progredienter Klinik. Zudem erleidet die Mehrheit der Patienten Rezidive, die nur schwer therapierbar sind. Die Entwicklung neuer Therapeutika ist in diesem Bereich der Hämatookologie daher besonders relevant und dank intensiver Forschung konnten einige molekularbiologische Veränderungen im Mantelzelllymphom festgestellt werden, die mögliche Angriffspunkte für neue Therapien darstellen. Nachdem PIM-Kinasen in vielen hämatologischen Tumoren, darunter auch im Mantelzelllymphom, vermehrt exprimiert werden, stellen diese ein geeignetes molekulares Target dar.

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Erprobung der Effektivität und Darstellung der Wirkungsweise der beiden neuartigen Substanzen IBL-202 und IBL-301 *in vitro* an etablierten Mantelzelllymphom-Zelllinien. Es handelt sich hierbei um kombinierte Inhibitoren, IBL-202 hemmt PIM-Kinasen sowie PI3K, IBL-301 zusätzlich auch mTor. Ihre Auswirkungen wurden zunächst als Monotherapie anhand von Proliferation, Zellzyklus und Zelltod untersucht sowie zusätzlich auf molekularbiologischer Ebene die Veränderungen in der Proteinexpression. Um die Zusammensetzung dieser beiden Substanzen zu bestätigen wurden weiterhin einige Kombinationen mit spezifischen Inhibitoren von PIM-Kinasen, PI3K und mTor durchgeführt. In Verbindung mit IBL-202 bzw. IBL-301 sollten diese Substanzen theoretisch keinen zusätzlichen Effekt zeigen, da ihre Wirkung schon in IBL-202 bzw. IBL-301 vorhanden ist. Zudem wurde die Effektivität der kombinierten Inhibitoren gegenüber den einzelnen Substanzen oder auch Kombinationen der spezifischen Inhibitoren untereinander verglichen. Schließlich wurde die Wirkung der beiden Inhibitoren in primären Zellen bestätigt.



## 3. Material und Methodik

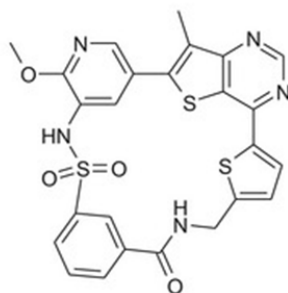
### 3.1 Material

#### 3.1.1 Verwendete Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die etablierten MCL-Zelllinien Jeko-1, Granta-519, Mino, Maver-1, Z-138 sowie Rec-1 verwendet. Mit Ausnahme von Z-138, welche von LGC Standards GmbH (Wesel, Deutschland) bezogen wurde, stammen alle übrigen Zelllinien von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland).

#### 3.1.2 Verwendete Inhibitoren

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich die beiden neuartigen Inhibitoren IBL-202 und IBL-301 verwendet. IBL-202 ist ein dualer Inhibitor und wirkt laut Herstellerangaben auf PIM-Kinasen und PI3K, der Triple Inhibitor IBL-301 hemmt zusätzlich auch mTor.



IBL-301

	IC50 (nM)				
	PI3K $\alpha$	mTOR	PIM1	PIM2	PIM3
IBL-301	2.5	134	18.2	13.6	3.17
IBL-202	10.1	4860	38.8	27.9	13.1

Nach [216]

Abbildung 7: IC50 von IBL-202 und IBL-301 sowie die chemische Struktur von IBL-301

	inhibiert	Hersteller
IBL-202	PIM/PI3K [216]	Inflection Biosciences, Dublin, Ireland
IBL-301	PIM/PI3K/mTor [216]	Inflection Biosciences, Dublin, Ireland
Idelalisib (Cal 101)	PI3K $\delta$ [203]	870281-82-6, Selleckchem, Houston, Texas, USA
Copanlisib (Bay 231)	PI3K [217]	Bayer Pharma AG, Berlin, Deutschland
Temsirolimus	mTor [218]	WAY-130779, Pfizer Inc, Groton, CT, USA
AZD1208	Pan-PIM [166]	AstraZeneca, London, England

### 3.1.3 Verwendete Antikörper

Antikörper	verwendete Verdünnung	Herkunft	Hersteller
Akt	1/1.000	Rabbit	Cell Signaling
Bcl-2	1/5.000	Mouse	Sigma-Aldrich
4E-BP1	1/500	Rabbit	Cell Signaling
Caspase-3 (8G10)	1/2.000	Rabbit	Cell Signaling
Caspase-9	1/500	Rabbit	Cell Signaling
GAPDH	1/100.000- 1/400.000	Mouse	Santa Cruz Biotechnology
GSK-3 $\beta$ (27C10)	1/1.000	Rabbit	Cell Signaling
PARP	1/500	Rabbit	Cell Signaling
phospho-Akt (Ser473) (193H12)	1/500	Rabbit	Cell Signaling
phospho-Akt (Thr308) (C31E5E)	1/500	Rabbit	Cell Signaling
phospho-4E-BP1 (Ser65)	1/1.000	Rabbit	Cell Signaling
phospho-4E-BP1 (Thr37/46)	1/1.000	Rabbit	Cell Signaling
phospho-eIF4E (Ser209)	1/500	Rabbit	Cell Signaling
phospho-GSK-3 $\beta$ (Ser9) (5B3)	1/500	Rabbit	Cell Signaling
Anti-Rabbit IgG	1/5.000		Promega
Anti-Mouse IgG	1/5.000		Promega

Sämtliche Antikörper wurden in 5% Albumin verdünnt, davon ausgenommen die Antikörper Bcl-2 und GAPDH, hier erfolgte die Verdünnung in G-Net.

Hersteller: Cell Signaling Technology Inc., Danvers, Massachusetts, USA  
 Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA  
 Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA  
 Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

### 3.1.4 Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen

	Hersteller
1,5M Tris (ph 6,8)	T20, Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland
1,5M Tris (ph 8,8)	T21, Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland
Albumin Fraktion V	8076.4, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
APS	A3678-25G, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Aqua bidest	laboreigene Anlage
Biocoll Separating Solution	L6113, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Bolt™, LDS Sample Buffer 4x	B0007, novex by life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bolt™, Sample Reducing Agent 10x	B0009, novex by life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Cell Titer Glo®	G7572, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Cell-Proliferation Reagent WST-1	1 644 807, Roche, Mannheim, Deutschland
complete Lysis-M, EDTA-free	Ref. 04 719 964 001, Roche, Mannheim, Deutschland
DMSO	A3672,0100, PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Elektrophorese-Puffer 10x	T18, Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland
Ery-Lyse-Puffer ph 7,2	Art. Nr. A0001-1, Apotheke Klinikum der Universität München, München, Deutschland
Ethanol 70%	11023303, CLN GmbH, Niederhummel, Deutschland
Gelatine	1.04070, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gel-Transfer-Puffer	T0047-5, Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	216763-100ML, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
IMDM	P04-20450, PANBiotech, Aidenbach, Deutschland
Isopropanol	CN09.3, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Luminol sodium salt	A4685-5G, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Methanol	1.06009.5000, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	T145.2, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	K305.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	S1804-1KG, Sigma-Adrich, St.Louis, Missouri, USA
NET 10x ph 7,7	L000999, Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland
PBS Dulbecco	L1825, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
p-Couramin Acid	C9008-5G, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	559763, BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	P5726, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	P0044, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Propidiumiodid-Lösung	70335, Fluka by Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Protein Marker V	27-2210, peqlab, Erlangen, Deutschland
Rnase A	12091-021, invitrogen™, life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30	3029.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	P04-16500, PANBiotech, Aidenbach, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	L4509-500G, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
TBS-Puffer 10x ph 8,0	T03290, Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	T07024-25ML, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Triton™ X-100	X100-1L, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Tween® 20	9127.2, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

#### Herstellung der verschiedenen Puffer und Lösungen:

Puffer	Herstellung
5% Albumin	5mg Albumin Fraktion V + 100ml TBST-Puffer + 1 Spatelspitze Natriumazid
5% Milch	5mg Milchpulver + 100ml TBST-Puffer
G-Net	1,25g Gelatine + 50ml NET 10x + 450ml Aqua bidest
PI-Puffer	500ml Aqua bidest + 40ml Propidiumiodid + 500µl Triton X + 500mg Natriumcitrat, mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf ph 8,0 eingestellt
SA	100mg Luminol + 26,67ml 1,5M Tris ph 8,8 + 373,3ml Aqua bidest
TBST-Puffer	900ml Aqua bidest + 100ml TBS-Puffer + 1ml Tween® 20

### Herstellung der SDS-PAGE-Gele:

	8%	12%	15%	Sammelgel
Aqua bidest	13,9ml	9,9ml	6,9ml	7,25ml
Rotiphorese® Gel 30	8ml	12,0ml	15ml	1,7ml
1,5M Tris (ph 8,8)	7,5ml	7,5ml	7,5ml	
1,5M Tris (ph 6,8)				0,8ml
10% SDS	0,3ml	0,3ml	0,3ml	0,1ml
10% APS	0,3ml	0,3ml	0,3ml	0,1ml
TEMED	0,018ml	0,012ml	0,012ml	0,01ml

### 3.1.5 Verwendete Geräte

Beschreibung	Hersteller
Inkubator/CO2-Wärmeschrank	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur™	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Elektrophoresekammer Xcell SureLock™ Mini-Cell	invitrogen von life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Transferkammer Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Entwicklungsmaschine TYPON Optimax	Raymed Imaging AG, Düringen, Schweiz
Vi-Cell™ XR	Beckman Coulter, Brea, Californien, USA
Zentrifuge Rotanta 46 RC	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ELISA-Reader GloMax® GM3000	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Sicherheitswerkbank S-1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl- Genkingen, Deutschland
Blockthermostat BT1302	DITABIS AG, Pforzheim, Deutschland

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkulturbedingungen**

Die Kultivierung sämtlicher Zelllinien erfolgte im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt. Alle Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) in RPMI 1640 Medium (PANBiotech) kultiviert, welches mit 10% FKS (PANBiotech) versetzt wurde. Die Passage der Zellen erfolgte zellzahlabhängig dreimal die Woche. Zur Einhaltung der sterilen Bedingungen wurden alle Zellkulturarbeiten unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Alle vier Wochen wurden die Zellen in neue Zellkulturflaschen überführt, wie auch alle drei Monate komplett durch frisch aufgetaute Zellen aus dem identischen Stock ersetzt.

### **3.2.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen**

Zum Einfrieren vitaler Zellen wurden pro Aliquot etwa  $10 \cdot 10^6$  Zellen für 10 Minuten bei 1000rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 92% FKS und 8% DMSO aufgenommen. Anschließend wurden diese sofort bei -80°C gelagert.

Zur Rekultivierung eingefrorener Zellen wurden die Aliquots im Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut und umgehend in 10ml vorgewärmtes Medium überführt. Diese Suspension wurde direkt abzentrifugiert um die Reste des zytotoxischen DMSO zu entfernen, der Überstand des Zentrifugates verworfen und die Zellen mit frischem Medium versetzt. Die weitere Kultivierung erfolgte im Inkubator bei 37°C, die Zellpassage erfolgte zellzahlabhängig dreimal die Woche.

### **3.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität mittels Vi-Cell™**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des Vi-Cell™ XR, einem Zähl-

gerät, welches die Trypanblauausschlussmethode automatisiert und standardisiert durchführt. Das Prinzip dieser Methode liegt im unterschiedlichen Verhalten toter und vitaler Zellen bei der Färbung mit Trypanblau. Vitale Zellen bleiben ungefärbt, da sie aufgrund einer intakten Zellmembran die Fähigkeit haben den Farbstoff aktiv wieder aus dem Zellinneren zu pumpen. Tote Zellen mit defekter Zellmembran hingegen werden angefärbt und können so von den vitalen Zellen unterschieden werden.

Das Vi-Cell™ führt diese Methode automatisiert durch. Hierfür gibt man ein Aliquot von 0,5ml der zu untersuchenden Zellsuspension in das Vi-Cell™ Gerät, welches diese aufnimmt, mit Trypanblau vermischt und durch eine Mikroskop-Durchflussskammer leitet. Eine Kamera nimmt dann 50 Bilder der Probe auf und wertet diese anhand von festgelegten Parametern wie Helligkeit und Kontrast aus. Das Bild wird hierzu in eine Abfolge von Pixeln umgewandelt, wobei jedem Pixel eine Graustufe von 0 (schwarz) bis 255 (weiß) zugeteilt wird. Zellen mit niedriger Graustufe erscheinen also dunkler und werden als nicht-viabel bestimmt. Es wurde für alle Proben die „Default“-Einstellung verwendet.

Zur Ausführung des Versuches wurden jeweils 5ml Zellsuspension in einer 6-Well Platte mit den jeweiligen Inhibitorkonzentrationen versehen und bei 37°C inkubiert. Nach 24h, 48h sowie nach 72h wurden dann 0,5ml der Zellsuspension entnommen und mit Hilfe des Vi-Cell™ analysiert. Die Versuche wurden dreifach durchgeführt, zur Auswertung wurden die Zellzahlen in Relation zur Zellzahl der Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt gesetzt.

### **3.2.4 Zelltodanalyse mit Annexin V-PE und 7-AAD-Färbung**

Um den Anteil apoptotischer Zellen in einer Kultur zu erfassen, wurde die Färbung mit PE Annexin V und 7-AAD durchgeführt und anschließend mit dem Durchflusszytometer analysiert. Hierfür wurde das von BD Biosciences Pharmingen bezogene Kit „PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I“ nach Herstellerangaben verwendet.

Bei Apoptose verändern sich Zellen auf charakteristische Art. In den frühen Phasen findet eine Umlagerung der Membran-Phospholipide statt, hierbei wird Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Seite der Zellmembran transloziert. Annexin V ist ein Protein, das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an Phospholipiden bindet und mit seiner hohen Affinität für Phosphatidylserin früh-apoptotische Zellen detektiert. In den späteren Phasen der Apoptose kommt es zu Schäden in der Zellmembran, die dazu führen, dass das Peptid 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) von spät-apoptotischen und toten Zellen aufgenommen werden kann. Die Kombination dieser zwei Substanzen führt dazu, dass man früh-apoptotische Zellen (Annexin V positiv, 7-AAD negativ) und spät-apoptotische Zellen (Annexin V und 7-AAD positiv) von viablen Zellen (Annexin V und 7-AAD negativ) unterscheiden kann.

Grenzen dieser Methode liegen darin, dass nicht differenziert werden kann, ob es sich tatsächlich um einen apoptotischen Stoffwechselweg handelt oder um einen anderen Signalweg, der im Zelltod resultiert. Folglich wurden in dieser Arbeit die früh-apoptotischen Zellen und spät-apoptotischen Zellen zusammengefasst und als Zelltod bezeichnet.

Zur Versuchsdurchführung wurden die Zelllinien initial auf Zelldichten von  $0,3 \cdot 10^6/\text{ml}$  (Jeko-1, Rec-1) bzw.  $0,4 \cdot 10^6/\text{ml}$  (Granta-519, Mino) gebracht und in Zellkulturflaschen mit den entsprechenden Inhibitorkonzentrationen inkubiert. Nach 24h, 48h und 72h wurden jeweils etwa 0,6ml Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen pipettiert, bei  $4^\circ\text{C}$  und 1500rpm für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend zweimalig mit PBS gewaschen. Darauf wurden 100 $\mu\text{l}$  Bindungspuffer, sowie jeweils 5 $\mu\text{l}$  des PE Annexin V und 7-AAD in die Röhrchen gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Schließlich wurden nochmals 400 $\mu\text{l}$  Bindungspuffer hinzugegeben und die Proben am Durchflusszytometer FACSCalibur<sup>TM</sup> innerhalb einer Stunde ausgewertet. Die Analyse der prozentualen Anteile der Zellen zu den jeweiligen Apoptose-Stadien erfolgte mit dem Programm FlowJo (Version 7.6.5., Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA). Zur Auswertung wurde die spezifische Apoptose nach Debatin et al. [219] mit den Mittelwerten der Triplicates berechnet. Diese Methode berücksichtigt die spontan auftretende Apoptose bei unbehandelten



Zellen. Hierbei wird der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen bei Anwesenheit von Therapeutikum ins Verhältnis gesetzt zu den apoptotischen Zellen in der unbehandelten Kontrollgruppe.

spezifische Apoptose (%) =  $100 \cdot (\text{tote Zellen mit Inhibitor (\%)} - \text{tote Zellen spontan in Medium (\%)}) / (100\% - \text{tote Zellen spontan in Medium (\%)})$

### **3.2.5 Zellzyklusanalyse**

Die Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid dient dem Nachweis von Veränderungen im Ablauf des Zellzyklus. In der G1-Phase bestehen die Chromosomen nur aus einem Chromatid, in der G2-Phase hingegen aus zwei Schwester-Chromatiden. Damit weisen die Zellen der G2-Phase doppelt so viel DNA auf wie die Zellen der G1-Phase. Der DNA-Gehalt der S-Phase, der Synthesephase, liegt zwischen dem der G1- und G2-Phase, da hier die DNA Verdoppelung stattfindet. Propidiumiodid lagert sich zwischen die DNA ein und kann sich deshalb in der G2-Phase doppelt so stark anreichern. Dies wird mit Hilfe eines Lasers im Durchflusszytometer gemessen, dabei wird die Fluoreszenzintensität des Kanals FL-2 auf der X-Achse, die Anzahl der detektierten Ereignisse auf der y-Achse eines Histogrammes aufgetragen. In dieser Darstellung wird die G1-Phase als erster Peak, die G2-Phase als zweiter Peak sichtbar.

Für die Analyse des Zellzyklus wurden aus einer Zellsuspension etwa 500.000 Zellen in ein FACS-Röhrchen pipettiert, für 5 Minuten bei 2000rpm und 4°C zentrifugiert und mit PBS einmal gewaschen. Nun wurde in jedes Röhrchen etwa 1ml kalter 70% Ethanol hinzugegeben, um die Zellen zu fixieren und die Zellmembranen für den Farbstoff durchlässig zu machen. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben bei -20°C für einen Tag eingefroren. Danach wurden die Proben wieder zügig auf Raumtemperatur gebracht, der Alkohol abzentrifugiert und jedes FACS-Röhrchen zweimalig mit PBS gewaschen. Um die RNA der Zellen aus dem gemessenen DNA-Gehalt zu eliminieren, wurde in jede Probe 50µl RNase hinzugegeben, anschließend die

Zellen mit 200µl Propidiumiodid-Puffer gefärbt. Schließlich folgte innerhalb einer Stunde die Analyse am Durchflusszytometer, hierbei wurden insgesamt 20.000 Ereignisse innerhalb eines Gates gemessen. Das Gate diente dazu, dass die 20.000 Ereignisse von lebenden Zellen gemessen werden und eine hohe Anzahl von apoptotischen Zellen die Ergebnisse nicht beeinflusst. Die prozentualen Anteile der Zellzyklusphasen wurden letztlich mit dem Softwareprogramm FlowJo (Version 7.6.5., Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA) errechnet. Die Zellzyklusanalyse wurde stets dreifach durchgeführt.

### **3.2.6 Western Blot**

Der Western-Blot ist eine bewährte Methode, um einzelne Proteine aus einem Proteingemisch zu identifizieren und zu detektieren. Per Elektrophorese werden die Proteine erst nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen (Blotting). Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern können dann die einzelnen Proteine aufgezeigt werden.

Um Proteine aus einer Zellsuspension zu gewinnen, wurden aus den verschiedenen Versuchsansätzen etwa  $1 \cdot 10^6$  Zellen entnommen und diese für 10 Minuten bei 2500rpm zentrifugiert. Zur Zellyse wurde das complete Lysis-M, EDTA free (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet, hierzu wurden pro 100µl Lysis-Reagenz je 10µl Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 und 3 ergänzt. Die Zellzahl der Zellsuspension wurde mit dem Vi-Cell™ XR kontrolliert um dann nach Abnahme des Überstandes das Lysis-M-Reagenz zellzahlabhängig mit 100µl pro  $1 \cdot 10^6$  Zellen möglichst exakt hinzuzugeben. Die Proben wurden 10 Minuten sanft geschüttelt und anschließend bei 14.000rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Schließlich wird der Überstand in ein neues Eppendorf Tube übertragen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Um die Proteine vor der Gelelektrophorese vollständig zu denaturieren, wurden sie nach Zugabe von LDS Sample Buffer und Sample Reducing Agent für 10 Minuten auf  $70^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur, je nach Größe der zu detektierenden Proteine in 8%, 12% oder 15% - SDS-

PAGE-Gelen (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) in Gelelektrophorese-Kammern zunächst 30min bei 61V, dann 1,5h bei 81V und schließlich bis zu 1h bei 121V. Der Proteintransfer auf eine PDVF (Polyvinylidenfluorid; GE Healthcare Life science, Großbritannien)-Membran erfolgte für mindestens 2h (15% SDS-PAGE-Gel) und maximal für 2,5h (8% SDS-PAGE-Gel) in einer Semi-Dry Western-Blot Transferkammer bei 250mA. Die Membranen wurden dann für 1h mit 5% Milch geblockt, um die unspezifischen Bindestellen der Proteine zu sättigen. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 Minuten mit TBST Puffer wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit den jeweiligen Antikörperverdünnungen inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen abermals dreimal für je 10 Minuten mit TBST gewaschen und anschließend für 1h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in 5% Milch inkubiert. Danach wurden die Membranen erneut dreimal für je 10 Minuten mit TBST gewaschen. Die Antikörper wurden schließlich mit Hilfe der HRP-Luminol-Reaktion (horseradish-peroxidase Reaktion) mittels CEA RP New medizinischen Röntgen-Filmen (Agfa HealthCare) sichtbar gemacht. Das für diese Reaktion nötige ECL wurde mit 3ml SA, 0,3ml SB und 0,9µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro Membran selbst hergestellt.

Um die Proteinbeladung zu kontrollieren, wurde auf jeder Membran auch der Antikörper des konstitutionell exprimierten GAPDH inkubiert. Dieses Protein ist zum Überleben der Zelle notwendig und wird auch bei molekularbiologischen Veränderungen durch Therapeutika in gleichen Mengen exprimiert. Somit kann die gleichmäßige Proteinbeladung der Membranen überprüft werden.

### **3.2.7 WST-1 Zell-Proliferationsassay**

Mit Hilfe des WST-1 Zell-Proliferationsassay wird die metabolische Aktivität einer Zellpopulation bestimmt. Dieser Assay beruht darauf, dass vitale und damit metabolisch aktive Zellen das Tetrazoliumsalz WST-1 (4-(3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzendisulfonat) zu Formazan

metabolisieren. Dies geschieht mit Hilfe von mitochondrialen Dehydrogenasen, wobei ein Farbumschlag entsteht, der kolorimetrisch mit einem Spektrophotometer (ELISA-Reader GloMax® GM3000) quantifiziert werden kann. Dabei gilt, je mehr lebende Zellen in der Zellpopulation vorhanden sind, desto höher ist die Gesamtaktivität der mitochondrialen Enzyme, desto mehr Formazan wird gebildet und umso stärker ist der Farbumschlag. Da eine geringe Menge Formazan auch nach dem Massenwirkungsgesetz gebildet wird und die theoretische optische Dichte ( $\text{Absorption}_{450\text{nm}} - \text{Absorption}_{600\text{nm}}$ ) von 0 nicht erreicht werden kann, muss dieser technische Fehler in Form eines Blank-Wertes von den gemessenen Absorptionswerten abgezogen werden. Dieser Blank-Wert enthält nur Medium und das zugesetzte WST-1 Reagenz.

Das WST-1 Zell-Proliferationsassay Kit wurde von Roche Diagnostics bezogen und nach Herstellerangaben ausgeführt. Die Zellen wurden auf die für die jeweilige Zelllinie optimale Zelldichte (zwischen  $0,25 \cdot 10^6/\text{ml}$  für Jeko-1 und  $0,4 \cdot 10^6/\text{ml}$  für Rec-1) gebracht und  $50\mu\text{l}$  davon in eine 96-Well Platte mit flachem Boden ausgesät. Alle Werte wurden dreifach angesetzt und mit dem ELISA-Reader photospektrometrisch gemessen. Die äußersten Wells wurden hierbei ausgespart und mit reinem Medium versehen um technische Ungenauigkeiten durch höhere Verdunstung in den äußeren Bereichen zu vermeiden. Nach einer Inkubation von 48h wurde in jedes Well  $10\mu\text{l}$  des WST-1 Reagenz gegeben und nach erneuter Inkubationsdauer von 2,5h die Absorption am ELISA-Reader gemessen. Das Formazan Produkt wurde hier bei 450nm gemessen, die Referenz-Wellenlänge lag bei 600nm.

Bei der Auswertung wurde zunächst von allen Werten der Blank-Wert abgezogen und anschließend ein Mittelwert aus der dreifachen Durchführung gebildet. Dieser wurde dann auf den Kontrollwert bezogen.

### **3.2.8 Cell-Titer-Glo®**

Der Cell-Titer Glo® ist ein Zell-Viabilitäts Assay, der die Anzahl von lebenden Zellen in einer Zellsuspension anhand des vorhandenen ATP quantifiziert. Das

Vorhandensein von ATP zeigt an, dass die Zellen metabolisch aktiv und damit viabel sind.

Die in diesem Assay hinzugegebene rekombinante Luciferase führt zu Zelllysis, setzt damit das ATP frei und generiert ein Lumineszenzsignal, proportional der vorhandenen ATP-Menge und damit der lebenden Zellen in der untersuchten Zellsuspension. Weiterhin werden zelleigene Enzyme gehemmt, die während der Zelllyse freigesetzt werden.

Die zu untersuchenden Zellsuspensionen werden in eine 96-Well Platte mit flachem Boden und weißem Polysteren pipettiert. Wie beim WST-1 Assay wurden auch hier die äußersten Wells nur mit Medium versehen, die restlichen Wells mit 50µl Zellsuspension und 50µl der jeweiligen verdünnten Inhibitoren. Alle Proben wurden dreifach angesetzt. Die Platten wurden dann für 48h bei 37°C inkubiert, anschließend auf Raumtemperatur runtergekühlt und die Proben mit je 100µl Reagenz versehen. Daraufhin wurden die Platten in Dunkelheit erst 2 Minuten sanft horizontal geschüttelt und anschließend 10 Minuten inkubiert. Schließlich wurde das Lumineszenzsignal mit einem Luminometer (ELISA-Reader GloMax® GM3000) gemessen. Ein Blankwert, der nur aus Medium und Reagenz besteht, wurde auf jeder Platte bestimmt und von allen Werten abgezogen. Die Werte wurden dann in Bezug zur Kontrolle gesetzt.

### **3.2.9 Kombinationsversuche und Kombinationsindices –**

#### **Fraction of Product**

Mit dem WST-1 Zellproliferationsassay als auch mit dem Cell-Titer-Glo® wurden sowohl die Effekte der einzelnen Inhibitoren sowie auch in verschiedenen Kombinationen gemessen. Um den Effekt der Kombinationen zu begreifen und mögliche synergistische oder auch antagonistische Wirkungsweisen zu erkennen, wurde die Formel des Fraction of Product nach Webb [220] in modifizierter Version herangezogen.

Hierbei wurde zunächst der ermittelte Wert der jeweiligen Probe ins Verhältnis gesetzt zu dem zu diesem Zeitpunkt mitbestimmten Wert der Kontrolle (Ratio to K) und ein Mittelwert gebildet von den stets dreifach durchgeführten Proben, dies ist nun ein prozentualer Wert. Die so von den Einzelsubstanzen ermittelten Werte wurden zunächst multipliziert und dann von 1 subtrahiert. Von diesem Ergebnis wurde dann der ebenso zuerst von 1 abgezogene Wert der Kombination subtrahiert.

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

Nach dieser Berechnung werden Zahlenwerte größer als oder gleich 0,1 als eine synergistische Wirkung und Werte kleiner als -0,1 als antagonistische Wirkung der beiden Inhibitoren bewertet. Werte, die zwischen diesen beiden Punkten liegen, wurden als rein additive Wirkung festgesetzt.

### **3.2.10 Umgang mit primären Zellen**

Um den beobachteten Effekt der Inhibitoren in den Zelllinienversuchen auch auf primäre Zellen übertragen zu können, wurden ausgewählte Kombinationen der verschiedenen Inhibitoren mit Patientenproben bzw. gesunden Lymphozyten im CellTiter-Glo® durchgeführt. Für die Verwendung der Patientenproben liegt ein Ethikvotum vor.

Aus Patientenproben in Form von Blut oder Pleuraerguss isolierten wir zunächst die Lymphozyten. Dies erfolgte mit Hilfe der Biocoll Separating Solution, die im 1:2 Verhältnis zur Probe hinzugegeben und anschließend bei Raumtemperatur für 20 Minuten ohne Bremse bei 900g zentrifugiert wurde. Dabei entstand der sogenannte Buffy Coat, der die Lymphozyten enthielt. Dieser wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Röhrchen gegeben, welches mit Medium aufgefüllt und für 10 Minuten bei 300g und 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet zur Erythrolyse mit 5ml Ery-Lyse-Puffer aufgelöst und für 5 Minuten auf Eis gestellt. Darauf füllten wir das Röhrchen wieder mit Medium auf und zentrifugierten es

für 5 Minuten bei 300g und 4°C. Zum Waschen wurde der Überstand abgekippt und mit frischem Medium wieder für 10 Minuten zentrifugiert. Nun konnte das Pellet in 20% IMDM-Medium (Isocove's Modified Dulbecco's Medium) (PANBiotech) aufgelöst werden und die Zellen für Versuche verwendet werden. Dieses IMDM-Medium mit höherem Vitamingehalt und Aminosäuren, sowie supplementiertem Albumin, Sojabohnen und Transferrin ist wesentlich stabiler bezüglich des pH-Wertes und somit für die empfindlicheren primären Zellen besser geeignet.

Diese Schritte waren bei den analysierten Patientenproben bereits erfolgt und die Zellen in FKS und 8% DMSO bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum zügigen Auftauen wird das Tube mit den Zellen in ein Wasserbad von 37°C gelegt, danach wird die Probe mit 10ml vorgewärmten RPMI 1640 Medium versehen und für 10min bei Raumtemperatur und 300g zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt und das Pellet mit 10ml IMDM-Medium, welches mit 20% FKS versehen ist, aufgelöst.

Im weiteren Verlauf wird der CellTiter-Glo® wie bereits beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, dass sämtliche Inhibitoren und Zellsuspensionen mit dem IMDM-Medium verdünnt werden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung durch IBL-202 und IBL-301

Um zunächst einen Eindruck der Wirkungsstärke der beiden Inhibitoren IBL-202 und IBL-301 zu gewinnen, wurde in einem ersten Experiment der anti-proliferative Effekt der beiden Inhibitoren IBL-202 und IBL-301 auf die MCL-Zelllinien nach unterschiedlicher Expositionsdauer untersucht. Hierzu wurden die 6 MCL-Zelllinien Jeko-1, Granta-519, Mino, Maver-1, Z-138 sowie Rec-1 mit verschiedenen Dosen von IBL-202 (0,0625 $\mu$ M, 0,125 $\mu$ M, 0,25 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M und 1 $\mu$ M) bzw. IBL-301 (0,0625 $\mu$ M, 0,125 $\mu$ M, 0,25 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M und 1 $\mu$ M) inkubiert und die Auswirkung anhand der lebenden Zellen nach 24h, 48h und 72h mittels des Vi-Cell™ XR ermittelt. Es konnte eine dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung nachgewiesen werden, die sich in ihrer Höhe allerdings zwischen den Zelllinien stark unterschied. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Ratio zum jeweiligen unbehandelten Tageswert.

Nach 24-stündiger Inkubation mit IBL-202 kann nur eine geringfügige Proliferationshemmung nachgewiesen werden (Abb. 8). Granta-519 und Maver-1 zeigen die kleinste Beeinträchtigung durch den Inhibitor, in Relation zu ihrer jeweiligen Kontrolle sind trotz Behandlung mit IBL-202 noch 88% viable Zellen messbar. Auch in Jeko-1 und Rec-1 sind bei der höchsten Konzentration von 1 $\mu$ M noch mindestens 80% viable Zellen vorhanden. Lediglich Mino und Z-138 zeigen sich mit bis zu 50% viabler Zellen sensibler auf die Inhibition. Auch nach 48 und 72 Stunden Inkubation ist diese Tendenz weiter zu beobachten. Zu dem 48 Stunden Zeitpunkt stellen sich Mino und Rec-1 mit 17% bzw. 37% am empfindlichsten gegenüber der Behandlung mit IBL-202 dar, Granta-519 und Maver-1 bleiben mit jeweils 79% und 75% am unempfindlichsten. Jeko-1 und Rec-1 liegen mit ihren Werten dazwischen. Nach 72 Stunden ist Mino auf bis zu 13% zurückgegangen und stellt sich damit als die Zelllinie heraus, die auf IBL-202 mit der stärksten Proliferationshemmung reagiert. Im Vergleich dazu



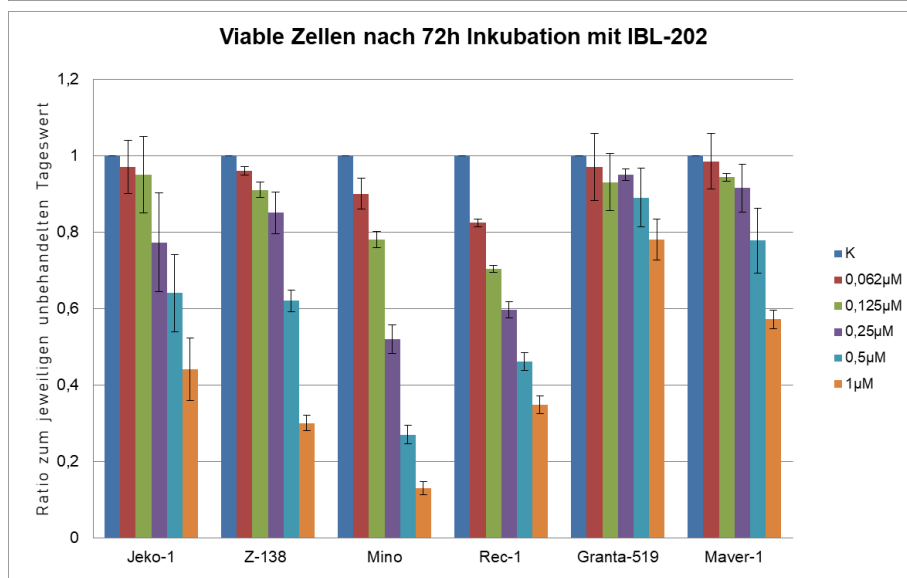
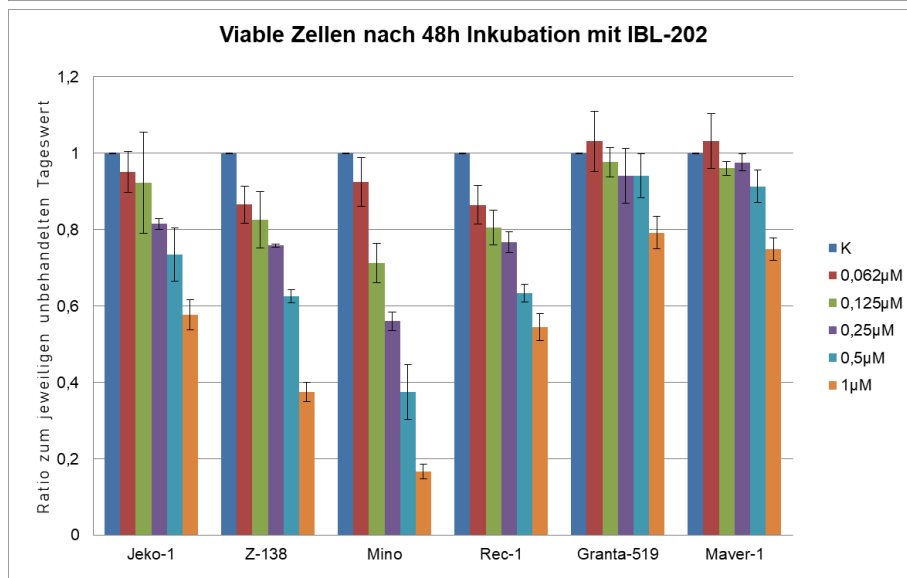
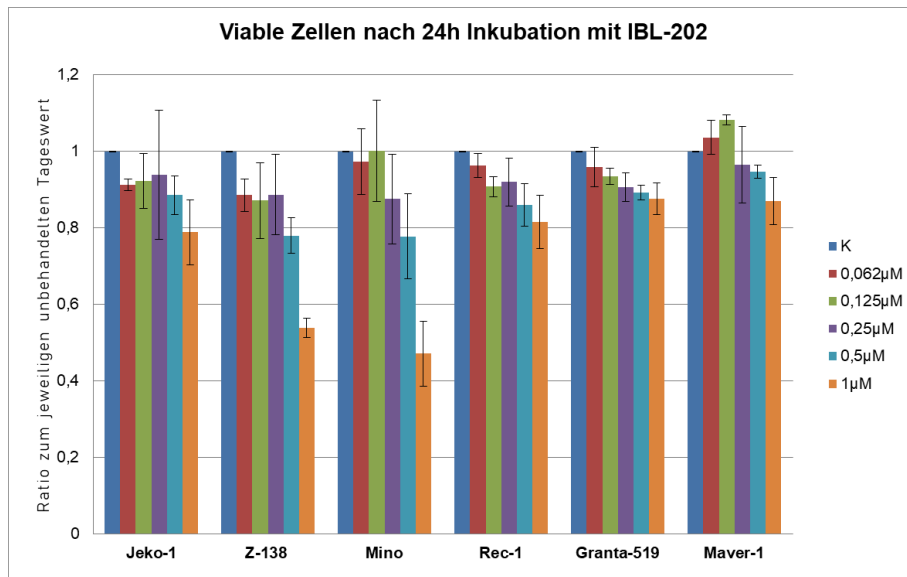


Abbildung 8: Dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung durch IBL-202

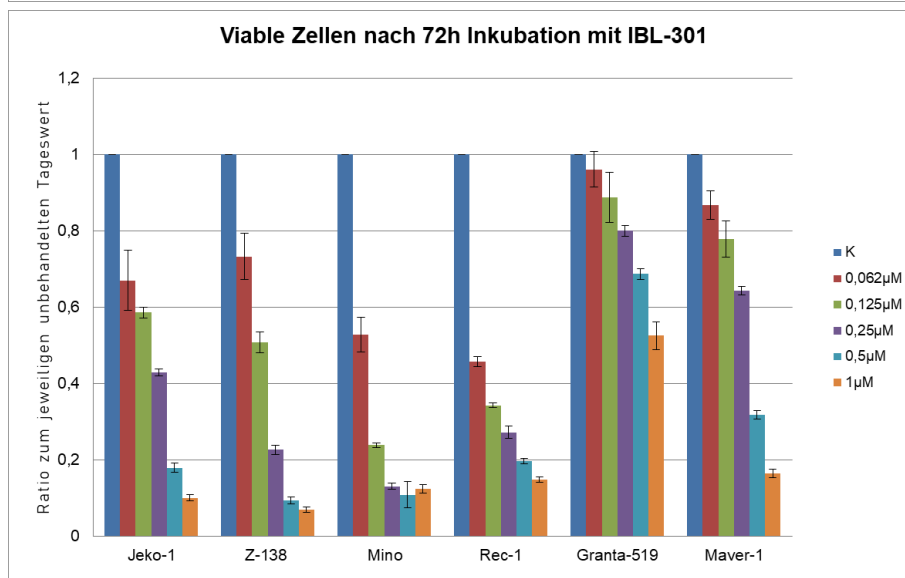
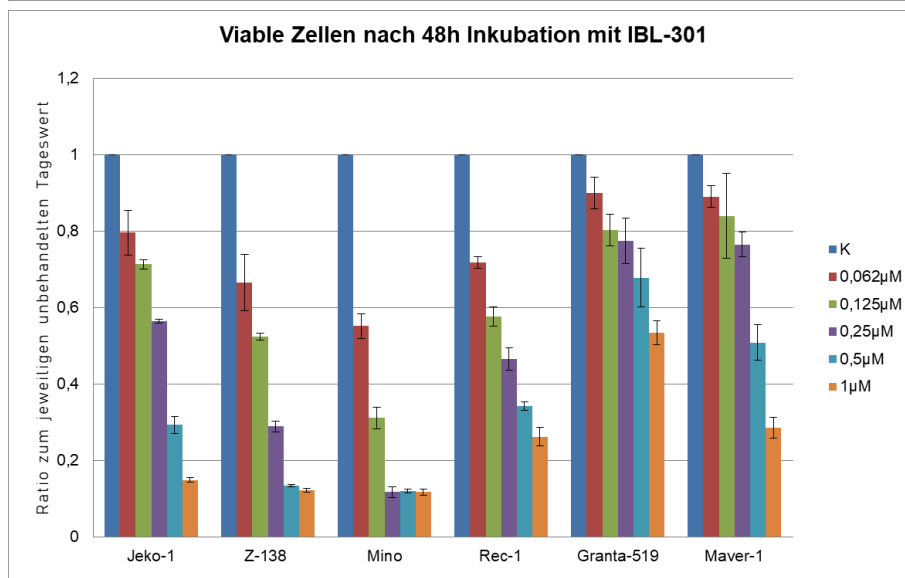
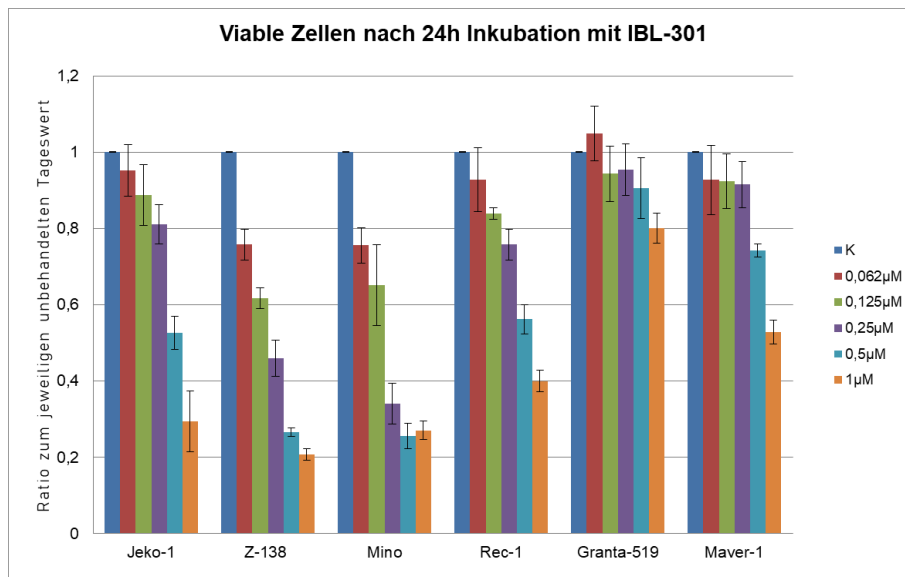


Abbildung 9: Dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung durch IBL-301

sind noch bis zu 78% lebende Zellen in Granta-519 nachweisbar, diese Zelllinie reagiert am geringsten auf eine Behandlung mit IBL-202. Insgesamt ist die Proliferationshemmung in allen Zelllinien stark dosisabhängig. Mit der geringsten Dosis von  $0,0625\mu\text{M}$  zeigt sich über alle Zelllinien hinweg die größte Beeinträchtigung in Rec-1 nach 72 Stunden mit einem Rückgang viabler Zellen auf 82%, mit  $1\mu\text{M}$  erreicht man zum gleichen Zeitpunkt eine Verringerung auf 35%. Dies ist auch in den unempfindlicheren Zelllinien wie Granta-519 zu beobachten.  $0,0625\mu\text{M}$  bewirkt eine Abnahme auf 92%,  $1\mu\text{M}$  auf 78%.

Nach 24 Stunden Inkubation mit IBL-301 ist im Vergleich zu IBL-202 ein bereits sehr viel größerer Effekt zu erkennen (Abb. 9). Bei  $1\mu\text{M}$  IBL-301 sind in Z-138 und Mino nur noch 20% bzw. 26% lebende Zellen messbar, auch in Granta-519 ist ein Rückgang von bis zu 80% nachweisbar. Nach 48 Stunden kann man in Mino mit  $0,25\mu\text{M}$  den gleichen Effekt bewirken wie mit  $0,5\mu\text{M}$  und  $1\mu\text{M}$ . In allen drei Konzentrationen sind lediglich noch 11% lebende Zellen vorhanden. Damit ist die maximale Wirkung in Mino bereits nach 48h und schon bei  $0,25\mu\text{M}$  erreicht, denn auch nach 72 Stunden ist in Mino kein weiterer Rückgang zu beobachten. Granta-519 ist auch für IBL-301 die unempfindlichste Zelllinie, dessen Effekt dennoch größer ist als bei IBL-202, nach 72 Stunden Inkubation sind konzentrationsabhängig noch mindestens 52% viable Zellen vorhanden. Für IBL-301 stellen Z-138 und Mino die empfindlichsten Zelllinien dar. Aber auch in Rec-1 kann ein Rückgang auf 45% lebende Zellen nach 72 Stunden schon mit einer geringen Dosis von  $62,5\text{nM}$  verursacht werden. Wie schon in IBL-202 ist auch für IBL-301 eine dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung nachweisbar. Auch wenn zwischen den Zelllinien starke Unterschiede in der Hemmung durch die beiden Inhibitoren vorliegen, gilt dennoch für alle, dass IBL-301 eine deutlich effektivere Wirkung vorweist. IBL-301 beeinflusst die Zellen stärker und innerhalb kürzerer Zeit in ihrer Proliferation.

Diese stärkere Proliferationshemmung von IBL-301 ist besonders klar zu erkennen, wenn man die viablen Zellen des jeweiligen Tageswertes prozentual zu der Ausgangszelldichte bezieht, hier am Beispiel von Mino (Abb. 10). Während durch die Behandlung mit IBL-301 ab einer Konzentration von  $0,125\mu\text{M}$  kein Wachstum mehr stattfindet, sondern die Zellen absterben, ist Proliferation im

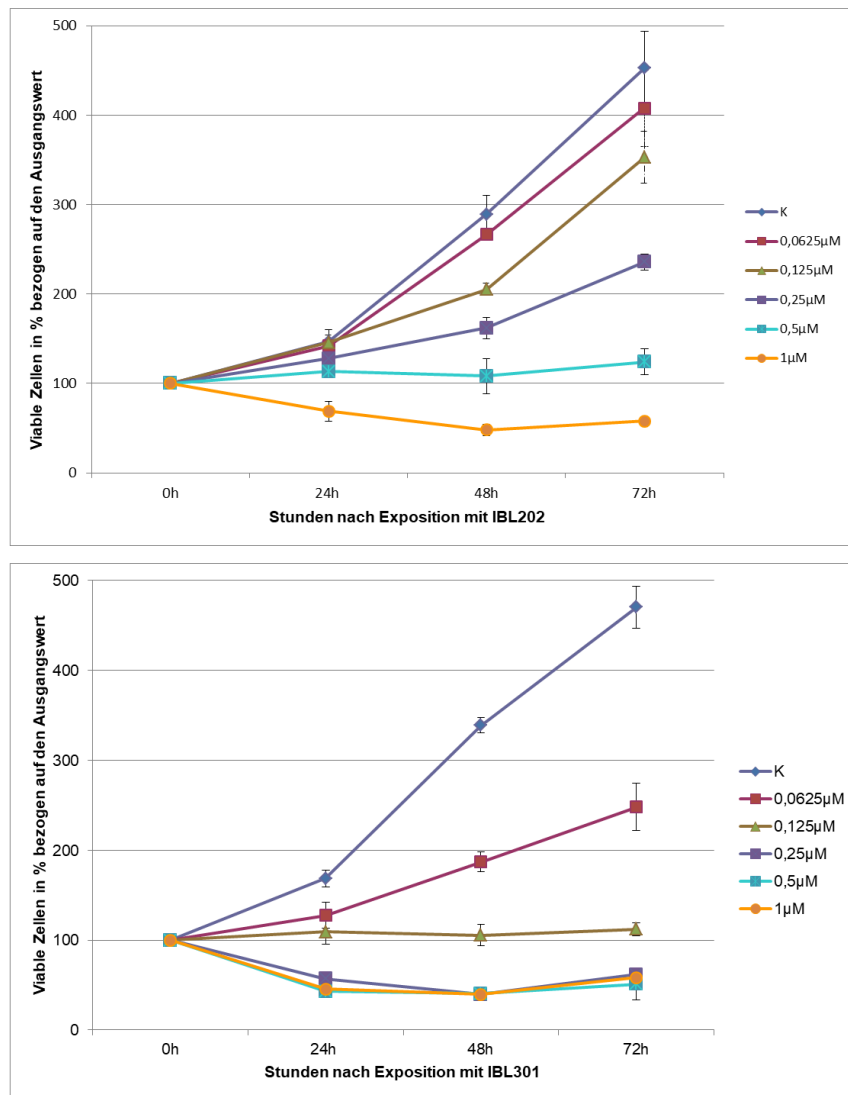


Abbildung 10: Darstellung der Proliferationshemmung in Mino

Die Schaubilder zeigen prozentual die viablen Zellen des jeweiligen Tageswertes in Relation zur Ausgangszell-dichte. Bei Inkubation mit IBL-202 ist langsames Wachstum noch möglich. Dieses erliegt im Beisein von IBL-301, die Zellen sterben vielmehr.

Beisein von IBL-202 noch bei hohen Konzentrationen möglich, obgleich sie langsamer wachsen als in der unbehandelten Kontrolle. Lediglich bei einer Konzentration von 1µM sterben die Zellen auch bei Inkubation mit IBL-202.

Diese Beobachtung lässt sich auch für die anderen Zelllinien bestätigen (Abb. 11). Sieht man sich die Ratio der viablen Zellen des jeweiligen Tageswertes zu der Ausgangszell-dichte für die höchste Konzentration von jeweils 1µM der beiden Inhibitoren an, lassen sich erneut erhebliche Unterschiede zwischen den

Substanzen feststellen. IBL-202 ermöglicht in dieser Konzentration fast allen Zelllinien noch eine Proliferation, lediglich die Zellen von Mino, wie oben bereits dargestellt, gehen bei diesen Konzentrationen zugrunde. Dahingegen verhindert die Inkubation der Zellen mit IBL-301 eine Zellteilung, die Zellen zeigen bereits nach 24h eine Beeinträchtigung der Proliferation. In diesem Fall bildet Granta-519 die Ausnahme, die Zellen zeigen sich der Wirkung von IBL-301 weitgehend gegenüber resistent.

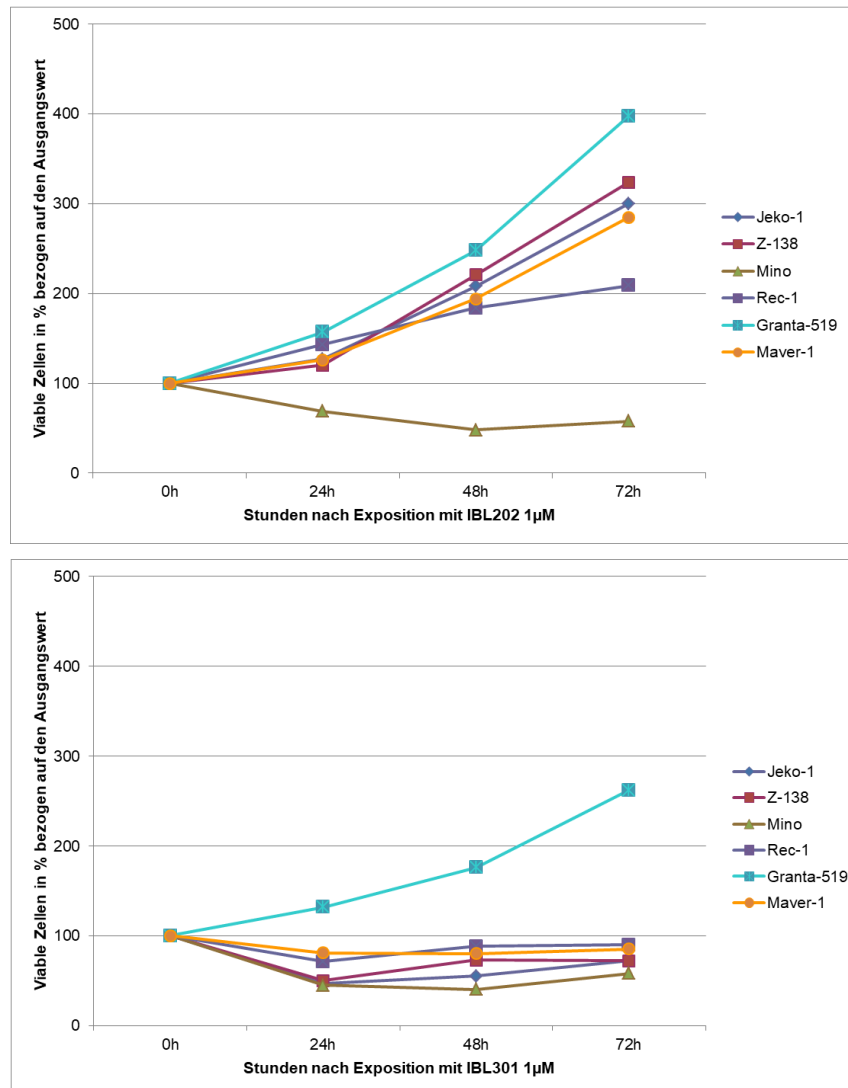


Abbildung 11: Darstellung der Proliferationshemmung in allen 6 Zelllinien für die Konzentration von 1 µM IBL-202 bzw. IBL-301

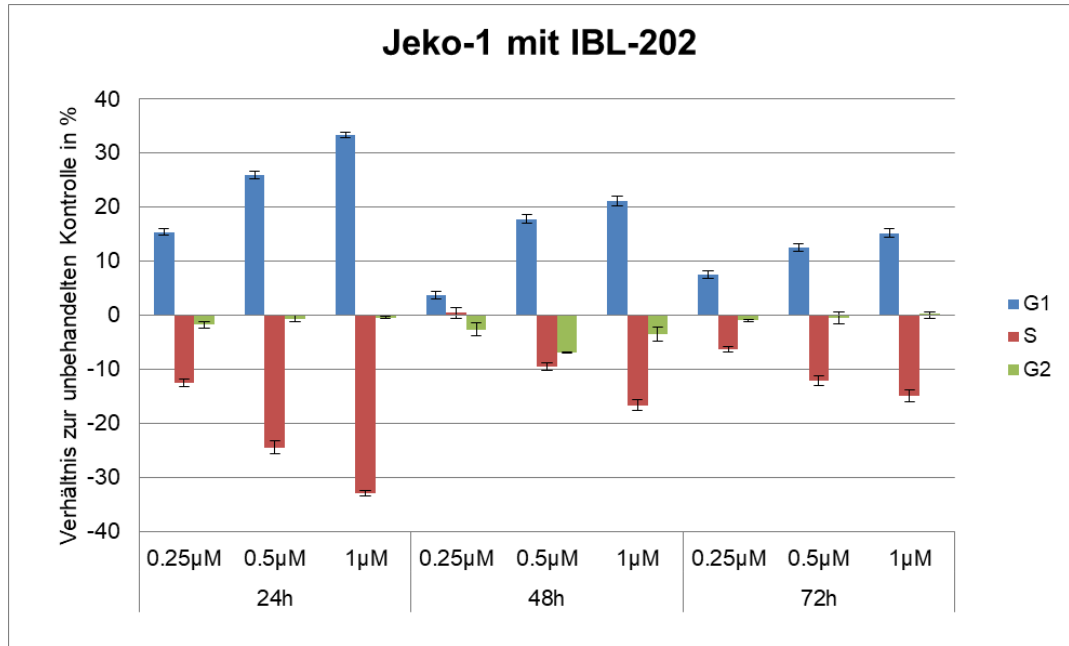
Die Schaubilder zeigen prozentual die viablen Zellen des jeweiligen Tageswertes in Relation zur Ausgangszellichte. Bei Inkubation mit IBL-202 ist Wachstum in dieser Konzentration noch möglich, mit Ausnahme Mino. IBL-301 hingegen verhindert in allen Zelllinien außer Granta-519 eine Zellproliferation.

## **4.2 Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit IBL-202 und IBL-301**

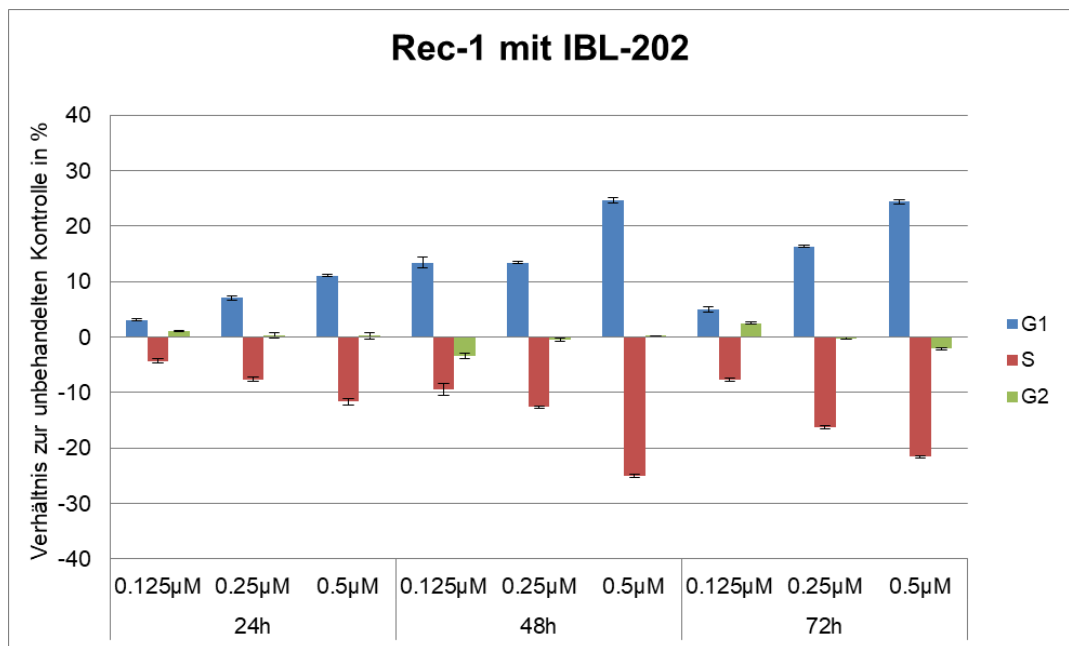
Nach den ersten Ergebnissen, dass sowohl IBL-202 und IBL-301 eine Proliferationshemmung bewirken, wurde nun zur Bestimmung des antiproliferativen Mechanismus eine Zellzyklusanalyse angeschlossen. Um eine zeit- oder dosisabhängige Dysregulation zu erkennen, wurden die MCL-Zelllinien Jeko-1, Granta-519, Mino und Rec-1 mit jeweils 3 Konzentrationen von IBL-202 und IBL-301 behandelt sowie Proben nach 24, 48 und 72 Stunden entnommen und analysiert. Aufgrund der unterschiedlichen Sensibilität der Zelllinien gegenüber den Inhibitoren und damit ausreichend vitale Zellen zur Analyse zu dem jeweiligen Zeitpunkt vorhanden waren, wurden die Konzentrationen von IBL-202 bzw. IBL-301 für jede Zelllinie angepasst. Jeko-1 und Granta-519 wurden mit 0,25µM, 0,5µM und 1µM IBL-202 sowie 0,125µM, 0,25µM und 0,5µM IBL-301 behandelt, während Rec-1 und Mino mit 0,125µM, 0,25µM und 0,5µM IBL-202 und 31,25nM, 62,5nM und 125nM IBL-301 inkubiert wurden.

Es konnte in allen vier Zelllinien eine Zunahme der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, d.h. ein G1-Arrest festgestellt werden, der sich je nach Konzentration und Auswahl des Inhibitors sowie nach Zeitpunkt der Analyse in seiner Größe erheblich unterschied. Der Anteil der Zellen in den anderen Zellzyklusphasen, S-Phase und G2-Phase, verringerte sich dementsprechend.

Betrachtet man zunächst die Wirkung des Inhibitors IBL-202, stechen Jeko-1 und Rec-1 als Zelllinien mit besonders hohem G1-Arrest hervor (Abb. 12 A und B). In Jeko-1 ist bereits nach 24h der größte Effekt nachweisbar, hier kommt es zu einer Zunahme von Zellen in der G1-Phase von bis zu 33,4%. Nach 48h bzw. 72h ist weiterhin ein G1-Arrest sichtbar, dennoch ist zu diesen Zeitpunkten das Ausmaß der Zellzyklusstörung wieder gemindert. Weiterhin kann man in Jeko-1 die eindeutige Dosisabhängigkeit des Effektes sehen, nach 24h Inkubation mit 0,25µM befinden sich 15,4% mehr Zellen in der G1-Phase im Vergleich zu den 33,4%, die mit 1µM Inhibitor erreicht werden. Diese Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors ist auch zu den späteren Zeitpunkten klar zu



A



B

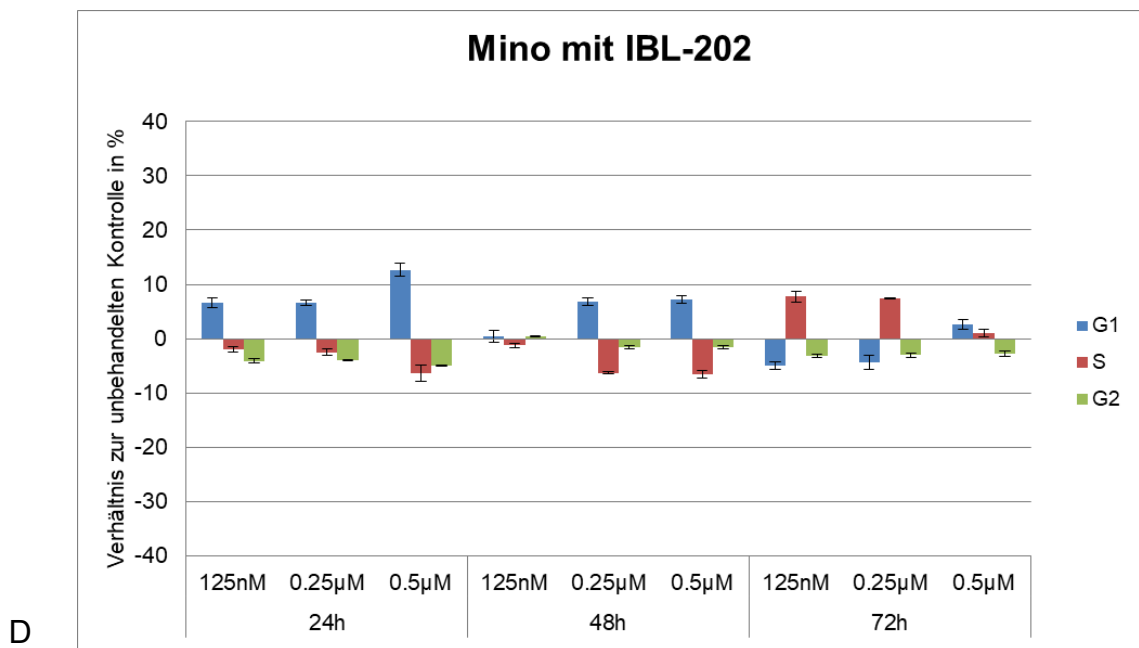
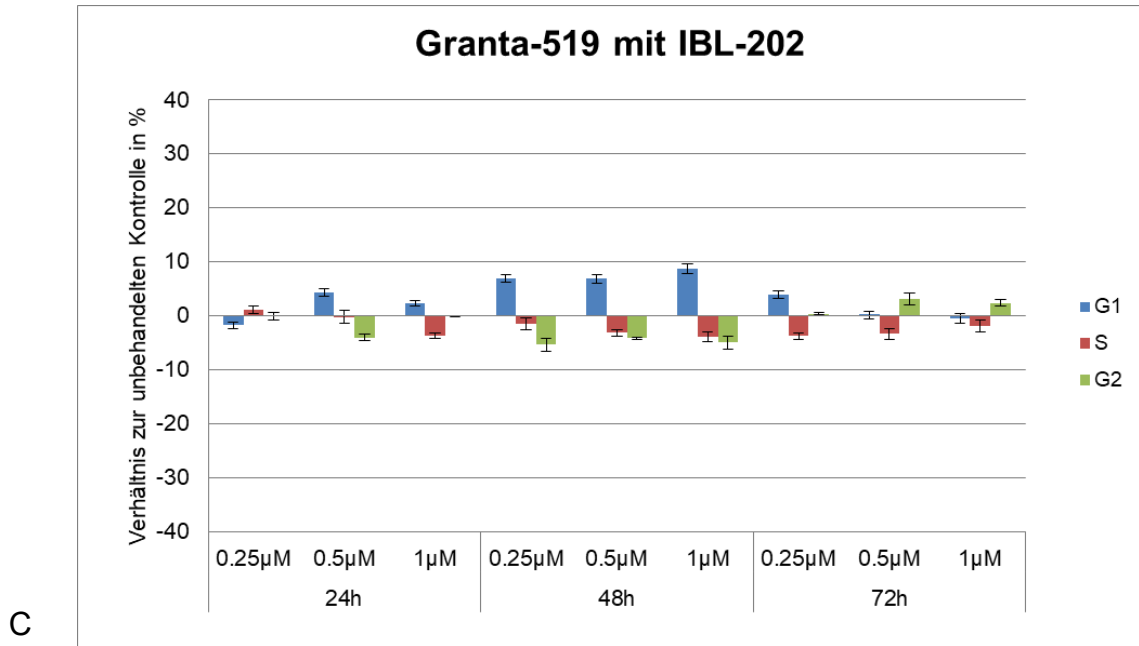


Abbildung 12 A-D: Zellzyklus-Analyse der Zelllinien Jeko-1, Rec-1, Granta-519 und Mino

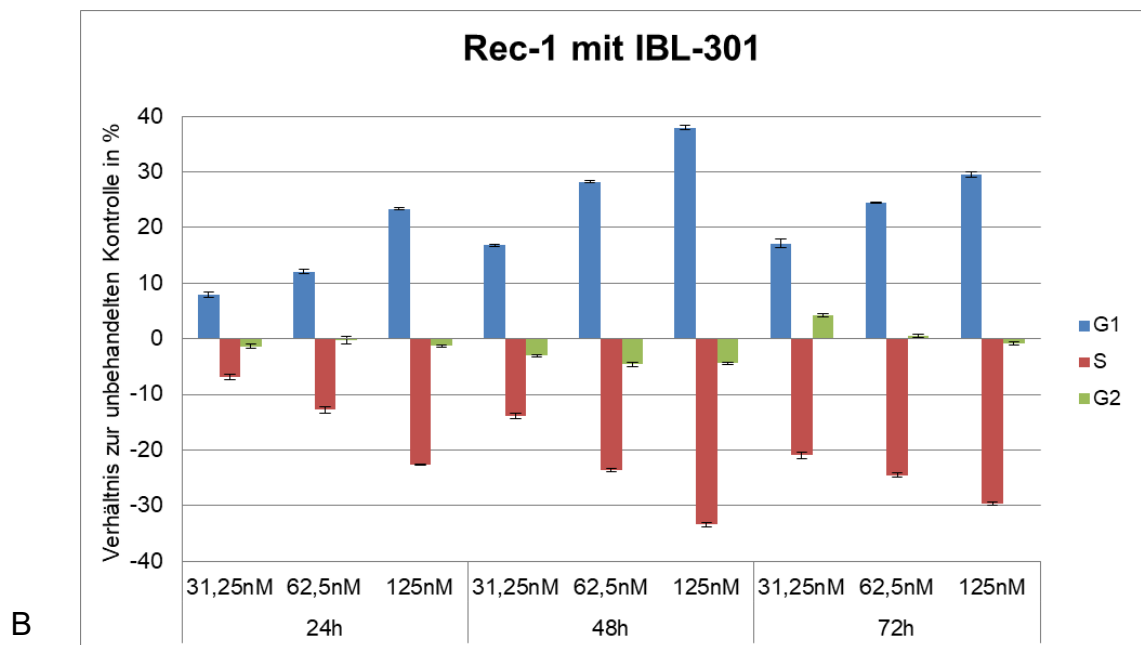
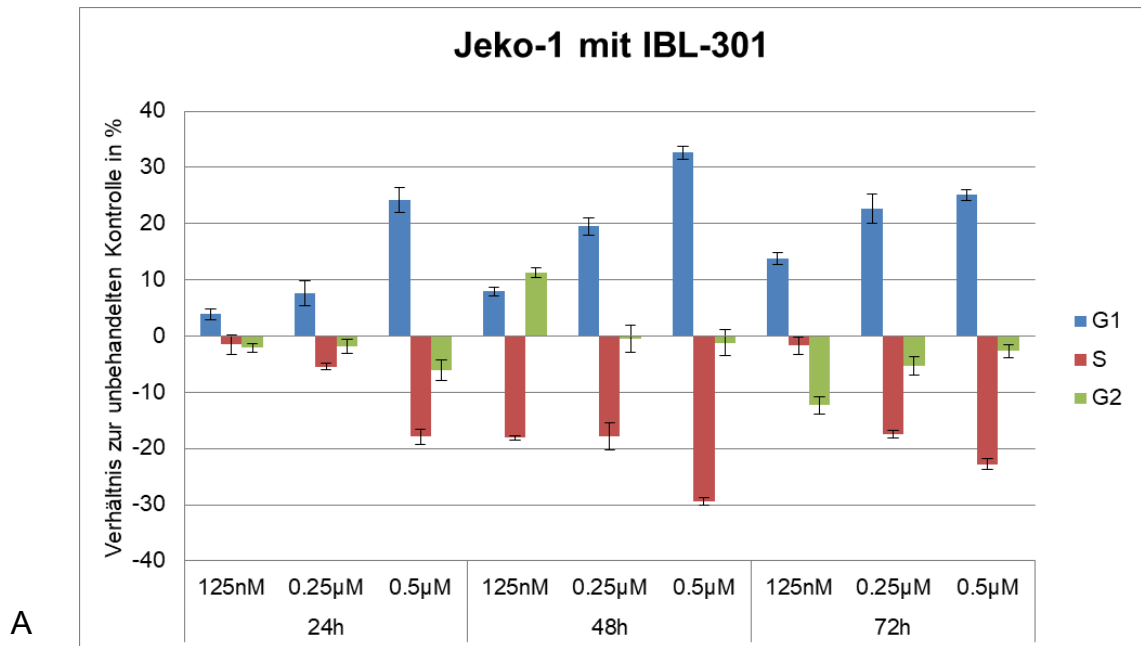
Nach Inkubation mit der jeweilig angegebenen Konzentration des Inhibitors IBL-202 für die angegebene Dauer kommt es zu einer Zunahme von Zellen in der G1-Phase von unterschiedlicher Höhe



erkennen. Rec-1 zeigt erst nach 48h den größten Effekt, hier werden nach einer Inkubation mit 0,5µM 24,7% mehr Zellen in der G1-Phase detektiert. Nach 72h ist mit einer Zunahme der G1-Phase um 24,3% ein nahezu unveränderter G1-Arrest sichtbar. Die Wirkung des Inhibitors auf den Zellzyklus in Rec-1 ist ebenfalls stark dosisabhängig. Scheinbar keine signifikante Wirkung hat IBL-202 auf Granta-519 (Abb. 12 C). Hier ist zu keinem Zeitpunkt der Analyse und mit keiner der durchgeführten Konzentrationen der Inhibitoren eine Zunahme der G1-Phase über 10% zu erkennen, ebenfalls lässt sich keine klare dosis- oder zeitabhängige Wirkung erkennen. Der höchste Effekt ist mit einer Zunahme der G1-Phase um bis zu 8,7% nach 48h sichtbar. Dennoch ist ein spezifischer Effekt von IBL-202 auf den Zellzyklus in dieser Zelllinie nicht klar zu erkennen. In Mino ist zwar nur ein geringer Effekt zu sehen, dennoch zeigt sich hier wieder eine deutliche Dosisabhängigkeit (Abb. 12 D). Der höchste G1-Arrest ist bereits nach 24 Stunden Inkubation erreicht, unter der maximalen Konzentration von 0,5µM nimmt der Anteil der Zellen in der G1-Phase um 12,6% zu. Zu späteren Zeitpunkten ist der Effekt weniger ausgeprägt.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit dem Effekt des Inhibitors IBL-301 auf den Zellzyklus dieser vier Zelllinien (Abb. 13 A-D), erkennt man, dass die Effektivität im Sinne eines G1-Arrestes bei diesem Inhibitor deutlich größer ist als die von IBL-202. Auch nach Inkubation mit IBL-301 erscheinen Jeko-1 und Rec-1 als die Zelllinien, deren Zellzyklus am stärksten beeinflusst werden. In beiden Zelllinien zeigt sich zu allen drei analysierten Zeitpunkten die Abhängigkeit der Höhe der Wirkung von der verwendeten Konzentration des Inhibitors: je höher die Konzentration, desto deutlicher der G1-Arrest. In beiden Zelllinien ist der höchste Effekt nach 48h nachweisbar, in Jeko-1 nimmt der Anteil der Zellen in der G1-Phase um 32,6% zu, in Rec-1 um 38%. Nach 24h Inkubation ist in Granta-519 bereits der ausgeprägteste Effekt sichtbar, der dennoch deutlich niedriger ausgeprägt ist als in den zuvor beschriebenen Zelllinien. Nach Inkubation mit 0,5µM IBL-301 sind 14,5% mehr Zellen in der G1-Phase nachweisbar, zu den Folgezeitpunkten nimmt der Prozentsatz wieder ab und liegt unterhalb der 10% Marke. Für Mino lässt sich eine maximale Zunahme der G1-Phase nach 24 Stunden Inkubation mit 0,5µM feststellen. Obwohl Mino in den vorigen

Versuchen als sehr empfindlich gegenüber beiden Inhibitoren war, zeigt sich hier ein nur sehr geringer G1-Arrest. Dies könnte daran liegen, dass zum Zeitpunkt der ersten Messung nach 24h bereits viele Zellen in Apoptose gegangen sind und anhand der wenigen Lebenden keine hohen Zellzyklusveränderungen messbar waren.



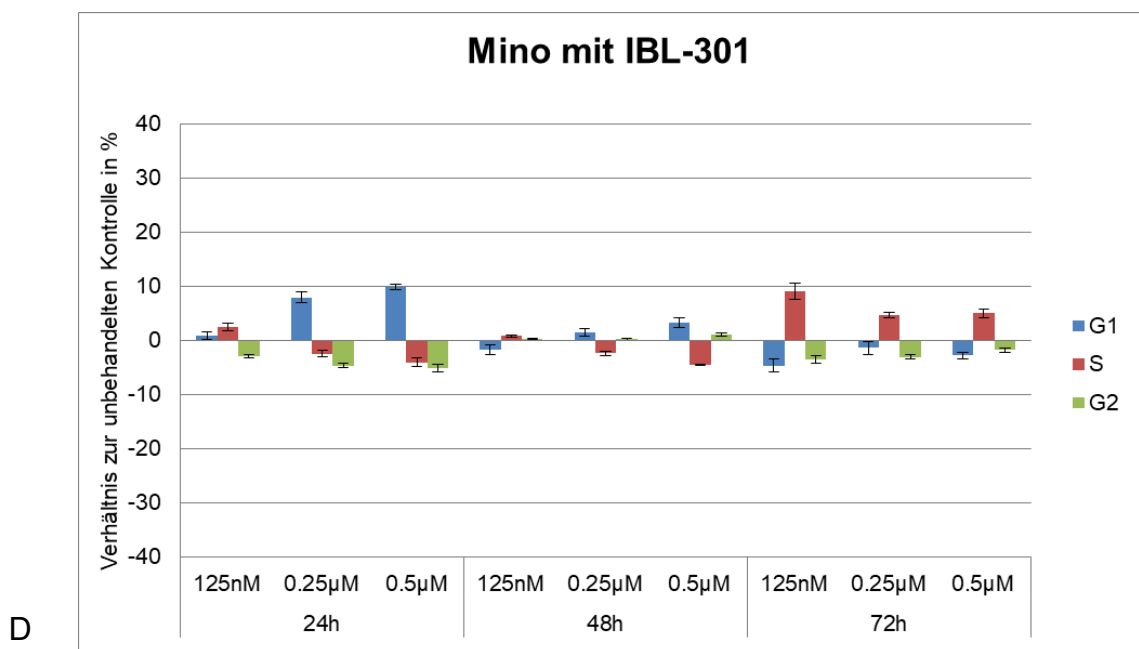
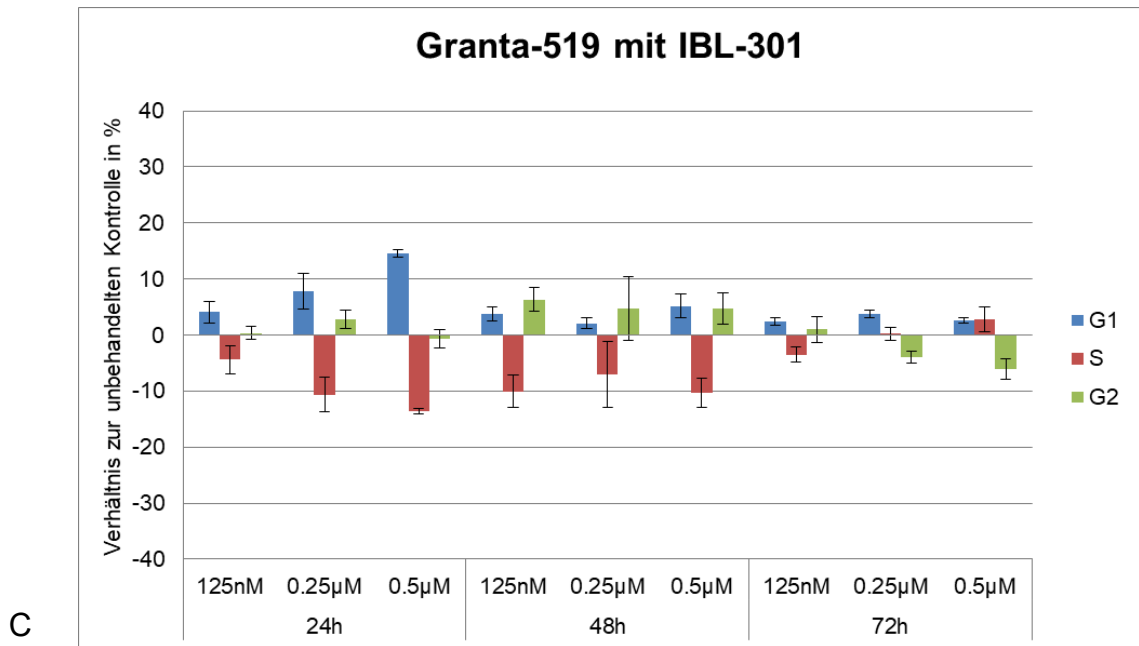


Abbildung 13 A-D: Zellzyklus-Analyse der Zelllinien Jeko-1, Rec-1, Granta-519 und Mino

Nach Inkubation mit der jeweilig angegebenen Konzentration des Inhibitors IBL-301 für die angegebene Dauer kommt es zu einer Zunahme von Zellen in der G1-Phase von unterschiedlicher Höhe

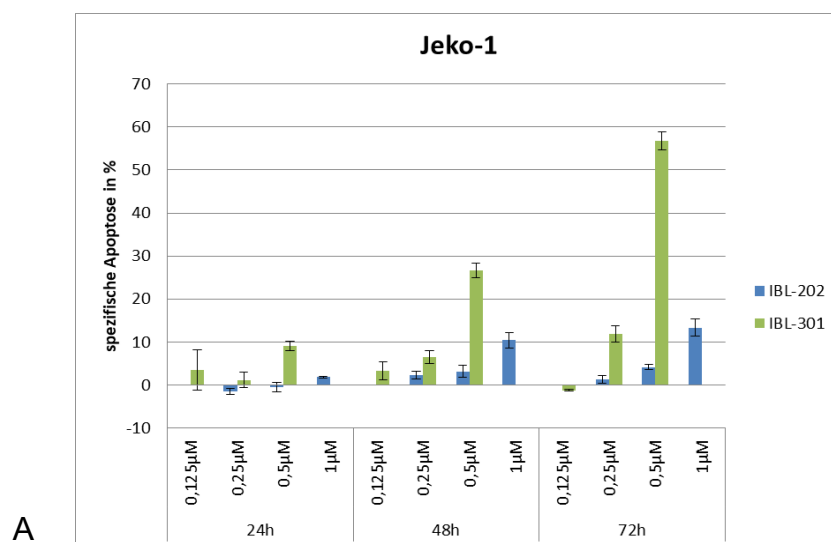
## **4.3 Spezifische Apoptoseanalyse nach Behandlung mit IBL-202 und IBL-301**

Um zu überprüfen, ob IBL-202 und IBL-301 neben einer Proliferationshemmung auch Zelltod induzieren, wurden wie bei der Zellzyklusanalyse die Zelllinien Jeko-1, Granta-519, Mino und Rec-1 mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren behandelt, von denen nach 24, 48 und 72 Stunden Proben entnommen und ausgewertet wurden. Da nach ersten Experimenten mit Jeko-1 und Granta-519 erkennbar war, dass der Zelltod im Zeitverlauf zunimmt, wurden Rec-1 und Mino nur noch nach 48 und 72 Stunden analysiert. Auch hier waren die gewählten Konzentrationen den Zelllinien und Inhibitoren angepasst, es wurden die gleichen Konzentrationen verwendet wie in der Zellzyklusanalyse. Wurde IBL-202 in Jeko-1 und Granta-519 in den Konzentrationen 0,25µM, 0,5µM und 1µM verwendet, in Mino und Rec-1 mit 0,125µM, 0,25µM und 0,5µM. Dagegen wurden Jeko-1 und Granta-519 mit 0,125µM, 0,25µM und 0,5µM sowie Mino und Rec-1 mit 31,25nM, 62,5nM und 125nM IBL-301 behandelt. Wie bereits erwähnt, wurde zur Auswertung die spezifische Apoptose nach Debatin et al. [219] berechnet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich eine deutliche dosis- und zeitabhängige Apoptose-Induktion sowohl für IBL-202 als auch für IBL-301 (Abb. 14 A-D) beobachten lässt, wobei die Wirkung in allen Zelllinien bei letzterem Inhibitor wesentlich höher ist. Weiterhin zeigen sich deutliche Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen den Zelllinien.

Mit dem Inhibitor IBL-202 lässt sich eine maximale spezifische Apoptose von 19% in Mino nach 72-stündiger Inkubation mit einer Konzentration von 0,5µM erreichen. Die 10% Marke wird weiterhin lediglich in Jeko-1 nach 72-stündiger Inkubation mit 1µM übertroffen, der Wert liegt hier bei 13%. In allen anderen Zelllinien bzw. zu anderen Zeitpunkten oder in geringeren Konzentrationen ist nur eine sehr schwache Apoptose-Induktion erkennbar, die Werte liegen alleamt unter 10%, eine geringe dosis- und zeitabhängige Wirkung lässt sich jedoch in den einzelnen Zelllinien erkennen.

Die Empfindlichkeit gegenüber IBL-301 ist deutlich höher, je nach Zelllinie jedoch sehr unterschiedlich. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Konzentrationen, ist wohl Mino die empfindlichste Zelllinie. In Mino erreicht man eine spezifische Apoptose-Rate von nahezu 38% nach Inkubation mit 0,125µM IBL-301 für 72 Stunden. In der nächstempfindlichsten Zelllinie Jeko-1 erreicht man mit dieser Konzentration keinen Effekt, nach Inkubation mit 0,25µM lässt sich dagegen eine spezifische Apoptoserate von 11,8% nachweisen, mit 0,5µM sogar von 56,7%. Die doppelte Dosis erzielt somit fast eine 5-fache Steigerung der Apoptose. In diesen beiden Zelllinien ist weiterhin die zeitabhängige Apoptose-Induktion ersichtlich. Nach 24h sieht man nur einen geringen Effekt, der zu jedem späterem Zeitpunkt ansteigt. Granta-519 scheint nahezu resistent gegenüber der Wirkung von IBL-301 zu sein, hier kann allein nach 48h ein gewisser Effekt beobachtet werden, mit 0,5µM wird eine spezifische Apoptose-rate von 13,5% erreicht. Dennoch scheint keiner der beiden Inhibitoren in den hier angewandten Dosierungen einen wesentlichen Effekt auf diese Zelllinie zu haben. Ähnliches scheint für Rec-1 zu gelten, jedoch haben wir hier mit den gleichen geringen Konzentrationen wie für Mino gearbeitet, die höchste Konzentration von IBL-301 lag bei 0,125µM. Nach 72-stündiger Inkubation zeigt sich bereits eine geringe dosisabhängige Apoptose-Induktion mit bis zu 12,5%, eine Steigerung des Effektes durch höhere Konzentrationen des Inhibitors scheint wahrscheinlich.



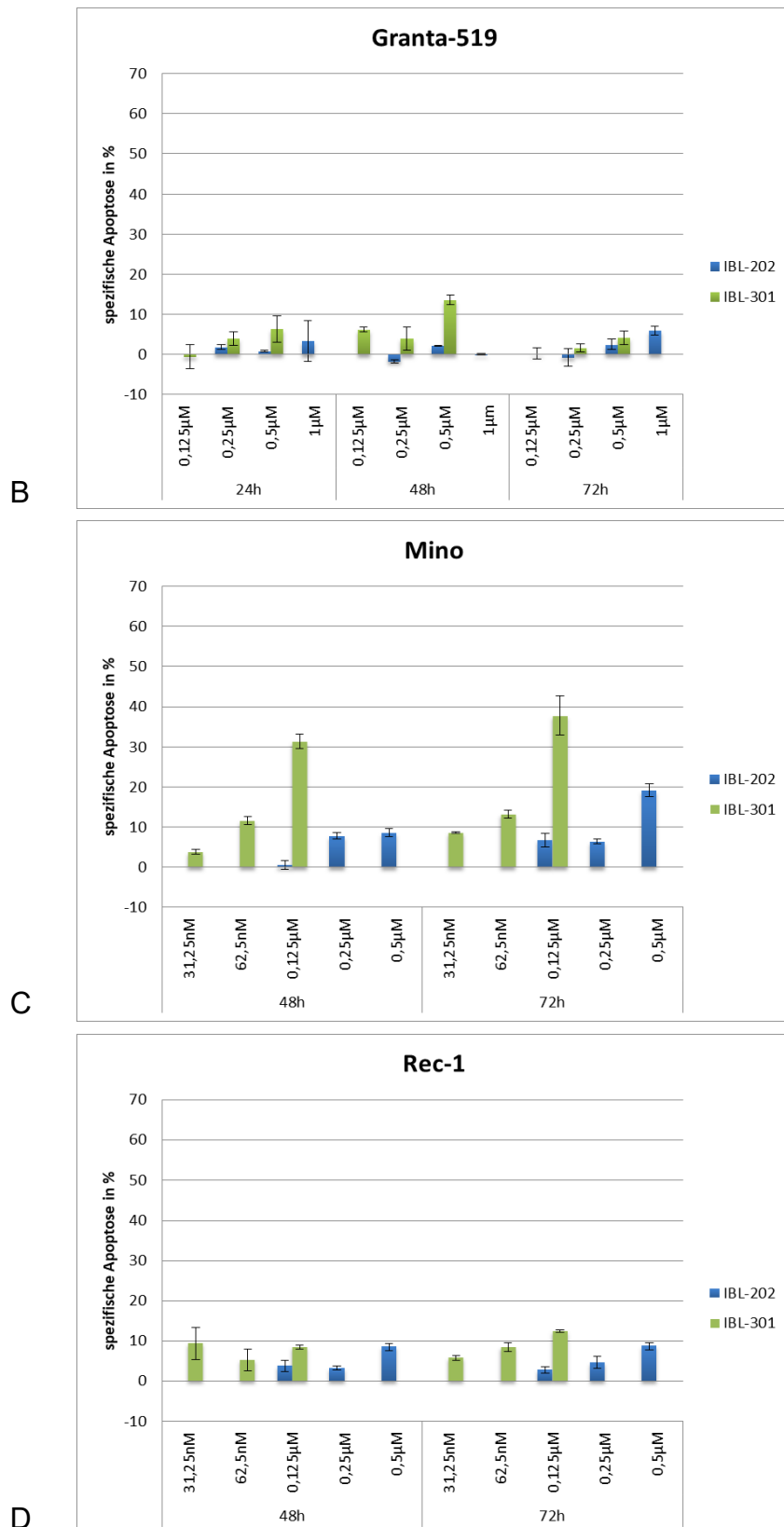


Abbildung 14 A-D: Die spezifischen Apoptoseraten nach Zelllinie

Untersucht wurden die spezifischen Apoptoseraten jeweils 24h, 48h und 72h nach Inkubation mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen.

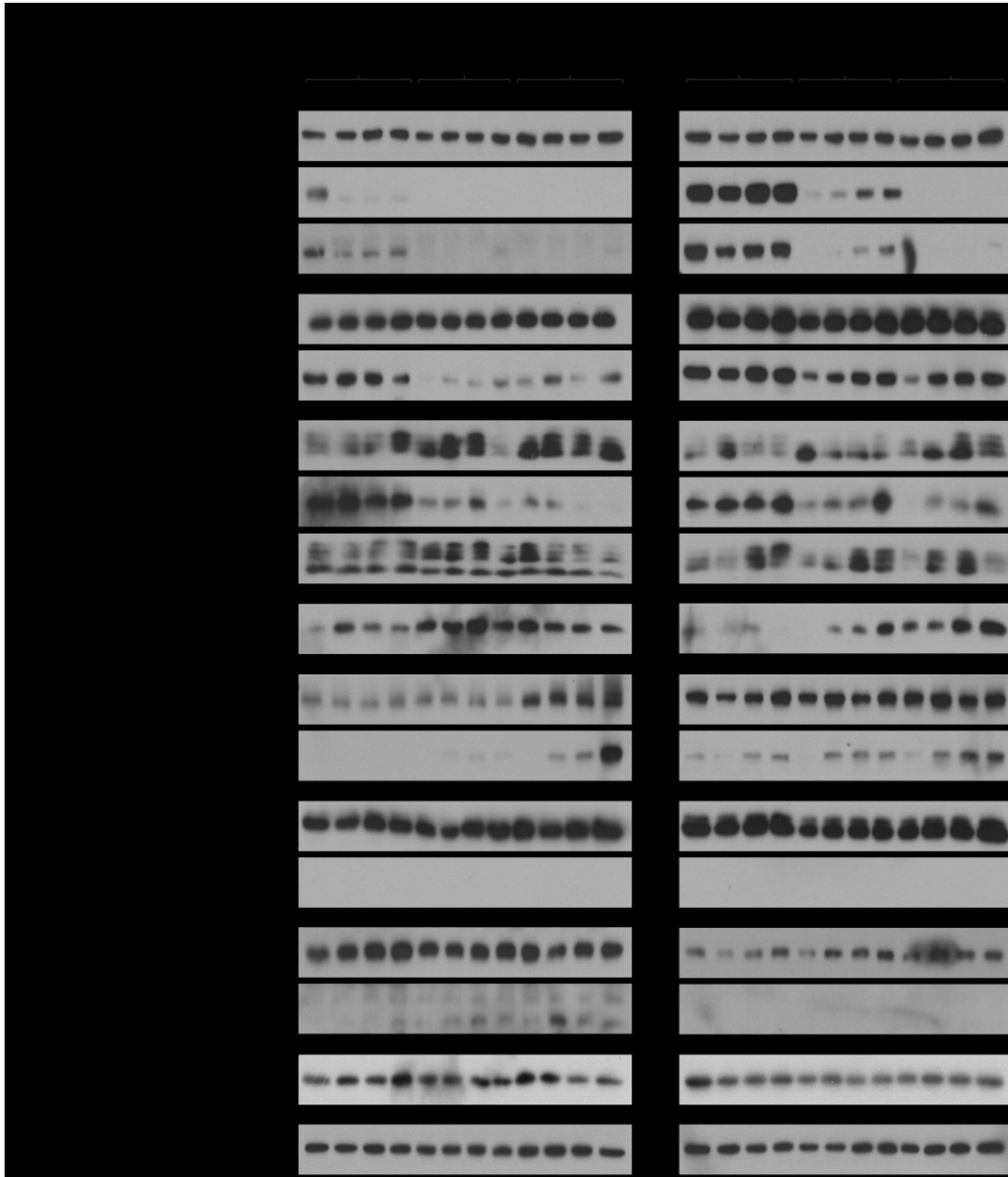
## 4.4 Proteinanalyse nach Behandlung mit IBL-202 und IBL-301

Um nähere Einblicke der Wirkung der beiden Inhibitoren IBL-202 und IBL-301 auf die Proteinexpression zu erhalten, wurde eine Proteinanalyse der Zelllinien Jeko-1, Granta-519, Mino und Rec-1 im Zeitverlauf durchgeführt. Hierzu wurden Proben von unbehandelten Zellen sowie von Zellen, die entweder mit 0,5µM IBL-202 oder 0,25µM IBL-301 behandelt wurden, nach 1, 4, 8 und 24 Stunden entnommen und daraus Protein gewonnen. Die Abbildungen 15 und 16 zeigen die Ergebnisse der Western-Blot Analysen.

Zunächst ist auf eine eingeschränkte Beurteilbarkeit der 24-Stunden Werte von Mino nach Behandlung hinzudeuten. Die sehr empfindliche Zelllinie Mino wurde durch die Inkubation mit den Inhibitoren so stark beeinflusst, dass selbst konstitutiv exprimierte Proteine wie GAPDH in ihrer Expression beeinträchtigt wurden und somit Veränderungen in den untersuchten Proteinen nur bedingt auf tatsächlich selektiv geringere Proteinexpressionen zurückzuführen sind. Vielmehr scheint nach 24 Stunden Behandlung mit IBL-301 in dieser Konzentration die Apoptoserate so hoch zu sein, dass überhaupt kein Protein mehr nachweisbar ist und mit IBL-202 zumindest die Proteinexpression im Ganzen stark eingeschränkt ist.

Akt ist ein Schlüsselenzym des PI3K/Akt/mTor-Signalweg (Abb. 6) und dadurch sensibel für eine PI3K- bzw. mTor-Inhibition. Unphosphoryliertes Akt bleibt in seiner Expression nahezu konstant, unabhängig der Zeit oder Behandlung mit einem der beiden Inhibitoren. Phosphoryliertes Akt, sowohl an Ser473 und Thr308 zeigt jedoch eine starke Verringerung der Expression, besonders deutlich ist dies in Granta-519 zu sehen. Zunächst zeigt sich eine nahezu vollständige Abnahme der Phosphorylierung von Akt, welche sich im Laufe der Zeit bis 24 Stunden wieder langsam erholt. Dass pAkt Ser473 in Jeko-1 auch in den unbehandelten Kontrollen zurückgeht, ist wohl auf den Stress durch den Versuchsansatz zurückzuführen. In Mino und Rec-1 scheint pAkt Thr308 sogar eher hochreguliert zu werden. Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen,

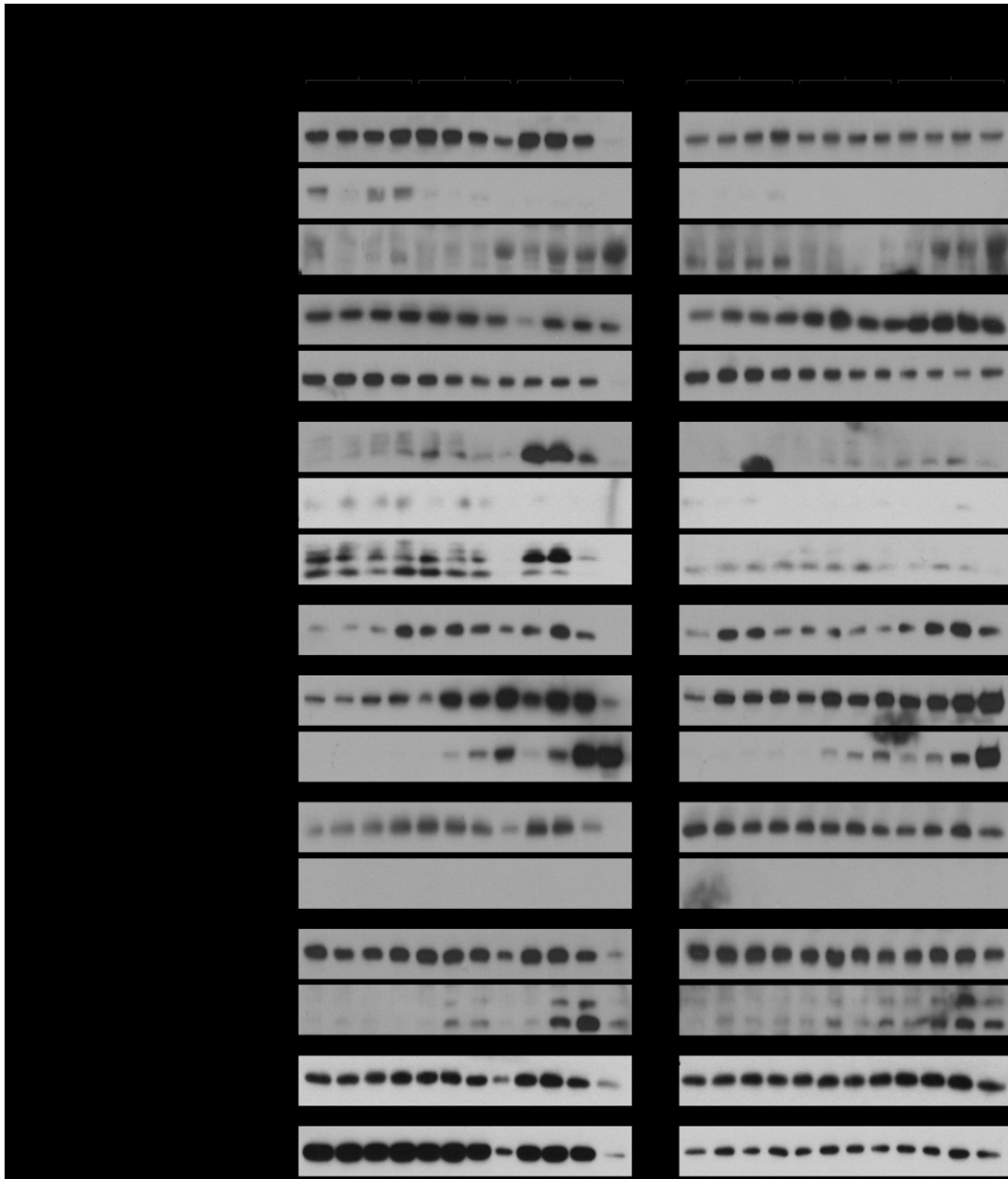
dass die Expression sehr gering ist, dadurch muss man den sekundären Antikörper mehrere Tage inkubieren lassen um das Protein nachzuweisen. Dies ermöglicht allerdings auch die unspezifische Bindung an andere Substrate.



*Abbildung 15: Western Blot Analysen mit den Zelllinien Jeko-1 und Granta-519*

*Jeweils von der Kontrolle als auch von den mit 0,5 $\mu$ M IBL-202 bzw. 0,25 $\mu$ M IBL-301 behandelten Zellen wurden jeweils nach 1h, 4h, 8h und 24h Proteine gewonnen und die Expression von spezifischen Proteinen mittels Antikörper detektiert.*





*Abbildung 16: Western Blot Analysen mit den Zelllinien Mino und Rec-1*

*Jeweils von der Kontrolle als auch von den mit 0,5μM IBL-202 bzw. 0,25μM IBL-301 behandelten Zellen wurden jeweils nach 1h, 4h, 8h und 24h Proteine gewonnen und die Expression von spezifischen Proteinen mittels Antikörper detektiert.*

GSK-3β ist ein wichtiges Substrat von Akt und wird von dieser an Ser9 phosphoryliert [180]. Wie bei Akt, zeigt das unphosphorylierte Protein keine Beeinträchtigung der Expression, in Jeko-1 und Granta-519 wird die Phosphorylierung aber deutlich beeinflusst. Nach einer Stunde Inkubation mit IBL-202

bzw. IBL-301 zeigt sich ein deutlicher Rückgang des phGSK-3 $\beta$ , in Jeko-1 geht diese praktisch komplett zurück und bleibt auch dauerhaft auf einem niedrigen Niveau. Auch bei der Behandlung von Rec-1 mit IBL-301 kommt es zu einer leichten Abnahme des phGSK-3 $\beta$ . Da GSK-3 $\beta$  ein Substrat der Akt ist, passen diese Resultate gut zu den oben diskutierten Ergebnissen der Akt-Phosphorylierung. In Granta-519 lässt sich, wie bereits bei Akt beobachtet, nach anfänglicher Herunterregulation des phGSK-3 $\beta$  im weiteren Verlauf eine erneute Zunahme der phosphorylierten Form erkennen. Diese Erholung der physiologischen Zellfunktionen ist durchaus als Ursache für die geringe Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion zu erwägen.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt ist 4E-BP1 ein wichtiges Substrat von den PIM-Kinasen als auch von mTor. Unphosphoryliert bindet und inaktiviert es den Translationsinitiationsfaktor eIF4E, durch Phosphorylierung geht diese Bindung verloren [221]. Wird eIF4E selber phosphoryliert, erhöht sich dessen Aktivität [222]. Granta-519 und Jeko-1 zeigen beide keine Veränderungen der Proteinlevel von 4E-BP1 oder der an Threonin 37/46 phosphorylierten Form. Zugabe von IBL-202 bzw. IBL-301 bewirkt jedoch bereits nach einer Stunde einen merklichen Rückgang des an Serin 65 phosphorylierten 4E-BP1, mit einem deutlich stärkeren Effekt durch IBL-301. Während die Phosphorylierung in Jeko-1 auch im weiteren Verlauf der Zeit nicht wesentlich zunimmt, scheint sie sich in Granta-519 den Proteinmengen der unbehandelten Kontrollen anzunähern. Rec-1 zeigt schon in der basalen Expression von 4E-BP1 nur geringe Proteinlevel, sodass Veränderungen der Phosphorylierungsmuster nicht zu erkennen sind. Ebenso lassen sich auch in Mino keine klaren Tendenzen feststellen. Mit der Behandlung von IBL-301 kommt es zwar zu einer prominenten Bande, dies betrifft jedoch sowohl die unphosphorylierte als auch die an Threonin 37/46 phosphorylierte Form. Die Inhibitoren führen zwar zu einer Zunahme des unphosphorylierten 4E-BP1, eventuell findet aber über andere Signalwege dann kompensatorisch eine Zunahme der Phosphorylierung statt. Über die Expressionsmuster von ph-eIF4E sind keine sicheren Aussagen möglich. In allen Zelllinien ist eine Abnahme nach 1 Stunde in der Kontrolle zu beobachten, dies lässt darauf schließen, dass dieses Protein bei Stress der Zel-

len, in diesem Falle durch den Versuchsansatz, weniger exprimiert wird. Abgesehen von technisch bedingter Abweichung scheint es hier aber zu keinen Veränderungen zu kommen.

PARP (Poly (ADP-Ribose) Polymerase) wie auch Caspase 3 und 9 sind wichtige Apoptosemarker. Caspase 3 [223] und Caspase 9 [224] sind beide wichtige Mediatoren der Apoptose, PARP ist an der DNA-Reparatur beteiligt [225] und kann sowohl von der Caspase 3 [226] als auch von Caspase 9 [224] gespalten werden. Das Spaltprodukt wiederum ist ein früher Apoptosemarker [227]. Neben ihren Proenzymen werden auch die gespaltenen Proteine detektiert, die bei Apoptose vorliegen und damit die eigentlichen Apoptosemarker darstellen. Die Apoptoserate ist umso höher, je mehr gespaltene Enzyme vorhanden sind. In allen vier Zelllinien lässt sich eine starke zeitabhängige Zunahme der gespaltenen PARP durch die Behandlung mit IBL-202 und IBL-301 erkennen. Deutlicher ausgeprägt ist dieser Effekt mit dem Inhibitor IBL-301, was gut mit den oben dargelegten Ergebnissen der spezifischen Apoptoseanalyse übereinstimmt. Ebenso ist gespaltene Caspase 9 nach Behandlung mit IBL-301 verstärkt nachweisbar. Gespaltene Caspase 3 ist hingegen in keiner Zelllinie vorhanden. Mino zeigt die größte Zunahme des gespaltenen PARP, dies bestätigt die Annahme, dass fehlendes Protein nach 24 Stunden Behandlung auf eine hohe Apoptoserate zurückzuführen ist.

Bcl-2 ist ein anti-apoptotisches Protein, dass die Bax-induzierte mitochondriale Freilassung von Cytochrom C verhindert [228]. Dieses Protein zeigt keinerlei Veränderungen seiner Expression, weder im Zeitverlauf noch durch Behandlung mit einem der beiden Inhibitoren.

## 4.5 WST-1 Kombinationsassays

Wie bereits erwähnt, ist IBL-202 eine Kombination aus einem PIM- und PI3K-Inhibitor, während IBL-301 noch eine zusätzliche mTor-Inhibition beinhaltet. Um diese Wirkmechanismen zu bestätigen, wurden beide Substanzen mit den jeweiligen spezifischen Inhibitoren dieser Zielsubstrate in Kombination getestet. Mit diesem Versuchsaufbau wollten wir darüber hinaus feststellen, ob neben einer additiven Wirkung bei einer Kombination von verschiedenen Inhibitoren auch gegebenenfalls eine synergistische Wirkung zustande kommt und bei welchen Inhibitoren dies der Fall wäre. Weiterhin versuchten wir, mit den Single-Inhibitoren eine in ihrer Effektivität möglichst gleichwertige duale bzw. dreifache Kombination herzustellen. Wir wählten hierfür Idelalisib und Copanlisib als Single-PI3K-Inhibitoren, sowie Temsirolimus als mTor-Inhibitor und AZD1208 als Pan-PIM-Inhibitor aus. Idelalisib und Copanlisib unterscheiden sich darin, dass Idelalisib selektiv die  $\delta$ -Untereinheit der PI3-Kinase hemmt, bei Copanlisib wird zusätzlich noch die  $\alpha$ -Untereinheit der Kinase gehemmt. Zunächst wurden WST-1 Zellproliferationsassays mit IBL-202 und IBL-301 in Kombination mit jeweils einem weiteren der oben genannten Single-Inhibitoren durchgeführt, schließlich testeten wir verschiedene Kombinationen der Single-Inhibitoren aus. Die Ergebnisse wurden mithilfe des Fraction of Product nach Webb in Relation zu der Wirkung der einfachen Anwendung von IBL-202 bzw. IBL-301 gesetzt, um eine mögliche additive, synergistische oder sogar antagonistische Wirkung der Inhibitoren in Kombination herauszufinden. Auch hier wurde der WST-1 Zellproliferationsassay in drei unabhängigen Experimenten und mit jeweils 3 Konzentrationen jedes Inhibitors durchgeführt. Diese Versuche wurde mit den Zelllinien Jeko-1, Granta-519, Mino und Rec-1 ausgeführt.

Die detaillierten Ergebnisse für die jeweilige Zelllinie und der einzelnen Kombination der verschiedenen Inhibitoren in den unterschiedlichen Konzentrationen sind in den Tabellen 1-4 farblich kodiert dargestellt. Zu erwarten wäre keine nennenswerte Zusatzwirkung in der Kombination von IBL-202 oder IBL-301 mit Copanlisib, Idelalisib oder bei IBL-301 auch mit Temsirolimus, da der Wirkungsmechanismus der Einzelsubstanzen theoretisch bereits in der IBL-Substanz

enthalten ist. Sollte die Kombination mit AZD einen Zusatznutzen zeigen, so würde dies daraufhin deuten, dass in den IBL-Substanzen keine Pan-PIM-Kinasen Hemmung vorliegt und durch die nun vorhandene Pan-PIM Hemmung eine Effektsteigerung erfolgt. Da IBL-202 keine mTor-Inhibition beinhaltet, ist bei dieser Kombination zumindest eine additive Wirkung anzunehmen. Die Kombination der Single-Substanzen lässt dies ebenfalls erwarten.

	Konzentration (in $\mu\text{M}$ )	Fp		Konzentration (in $\mu\text{M}$ )	Fp
<b>IBL-202+Cop</b>	0.25 + 0.075	-0.03	<b>IBL-301+Cop</b>	0.125 + 0.075	-0.16
	0.5 + 0.15	-0.11		0.25 + 0.15	-0.11
	1 + 0.3	-0.06		0.5 + 0.3	-0.03
<b>IBL-202+Ide</b>	0.25 + 1.25	0.09	<b>IBL-301+Ide</b>	0.125 + 1.25	-0.12
	0.5 + 2.5	0.02		0.25 + 2.5	0.02
	1 + 5	0.04		0.5 + 5	-0.01
<b>IBL-202+Tem</b>	0.25 + 0.0025	-0.01	<b>IBL-301+Tem</b>	0.125 + 0.0025	-0.02
	0.5 + 0.005	0.07		0.25 + 0.005	-0.09
	1 + 0.01	0.09		0.5 + 0.01	0.01
<b>IBL-202+AZD</b>	0.25 + 1.25	0.09	<b>IBL-301+AZD</b>	0.125 + 1.25	0.23
	0.5 + 2.5	0.21		0.25 + 2.5	0.13
	1 + 5	0.11		0.5 + 5	-0.02
<b>AZD+Cop</b>	1.25 + 0.075	0.06	<b>Tem+Ide+AZD</b>	0.0025 + 1.25 + 1.25	0.55
	2.5 + 0.15	0.10		0.005 + 2.5 + 2.5	0.47
	5 + 0.3	0.09		0.01 + 5 + 5	0.47
<b>AZD+Ide</b>	1.25 + 1.25	-0.02	<b>Tem+Cop+AZD</b>	0.0025 + 0.075 + 1.25	0.48
	2.5 + 2.5	0.35		0.005 + 0.15 + 2.5	0.37
	5 + 5	0.45		0.01 + 0.3 + 5	0.18
<b>AZD+Tem</b>	1.25 + 0.0025	-0.30			
	2.5 + 0.005	0.01			
	5 + 0.01	0.39			

Tabelle 1: Fraction of Product nach Webb für Jeko-1

Tabellarische Darstellung der berechneten Fraction of Product (Fp) für Jeko-1 mit den jeweils aufgeführten Substanzen und ihren verschiedenen Kombinationen. Tabelle 1-4: Zahlenwerte  $\geq 0,1$  bedeuten eine synergistische Wirkung (in grün dargestellt), Werte  $< -0,1$  eine antagonistische Wirkung der beiden Inhibitoren (in rot). Werte dazwischen wurden als rein additive Wirkung bewertet (in blau). (Ide= Idelalisib, Cop= Copanlisib, Tem= Temsirolimus)

	Konzentration (in $\mu\text{M}$ )	Fp		Konzentration (in $\mu\text{M}$ )	Fp
<b>IBL-202+Cop</b>	0.25 + 0.075	-0.01	<b>IBL-301+Cop</b>	0.125 + 0.075	-0.11
	0.5 + 0.15	-0.10		0.25 + 0.15	-0.18
	1 + 0.3	-0.01		0.5 + 0.3	-0.06
<b>IBL-202+Ide</b>	0.25 + 1.25	-0.17	<b>IBL-301+Ide</b>	0.125 + 1.25	-0.11
	0.5 + 2.5	-0.11		0.25 + 2.5	-0.13
	1 + 5	-0.03		0.5 + 5	-0.07
<b>IBL-202+Tem</b>	0.25 + 0.0025	-0.04	<b>IBL-301+Tem</b>	0.125 + 0.0025	-0.09
	0.5 + 0.005	-0.06		0.25 + 0.005	-0.12
	1 + 0.01	0.02		0.5 + 0.01	-0.02
<b>IBL-202+AZD</b>	0.25 + 1.25	-0.05	<b>IBL-301+AZD</b>	0.125 + 1.25	0.03
	0.5 + 2.5	-0.30		0.25 + 2.5	0.10
	1 + 5	0.16		0.5 + 5	0.05
<b>AZD+Cop</b>	1.25 + 0.075	0.05	<b>Tem+Ide+AZD</b>	0.0025 + 1.25 + 1.25	-0.22
	2.5 + 0.15	-0.03		0.005 + 2.5 + 2.5	-0.16
	5 + 0.3	-0.06		0.01 + 5 + 5	-0.09
<b>AZD+Ide</b>	1.25 + 1.25	0.00	<b>Tem+Cop+AZD</b>	0.0025 + 0.075 + 1.25	0.13
	2.5 + 2.5	-0.06		0.005 + 0.15 + 2.5	0.30
	5 + 5	-0.17		0.01 + 0.3 + 5	0.14
<b>AZD+Tem</b>	1.25 + 0.0025	0.37			
	2.5 + 0.005	0.27			
	5 + 0.01	-0.02			

Tabelle 2: Fraction of Product nach Webb für Granta-519

In unseren Versuchen fallen die Ergebnisse zwischen den Zelllinien unterschiedlich aus, die verschiedenen Zusammensetzungen müssen einzeln betrachtet werden. Konzentriert man sich auf die synergistischen Wirkungen, so sind diese in den Kombinationen von IBL-202 bzw. IBL-301 und AZD zu beobachten, welches den Schluss erlaubt, dass AZD eine umfassendere PIM-Hemmung zulässt als die IBL-Substanzen alleine. Dennoch findet sich dieser Effekt bei jeweils unterschiedlichen Konzentrationen in unterschiedlichem Ausmaß sowie fehlt dieser komplett bei Mino nach Inkubation mit IBL-301+AZD. Synergismus findet sich auch in den verschiedenen Kombinationen der Single-Inhibitoren. In Jeko-1 zeigt sich z.B. in den Dreifachkombinationen von Temsirolimus, AZD und Idelalisib bzw. Copanlisib in allen Konzentrationen ein syner-

gistisches Wirkungsprofil. Dies ließ sich in den anderen Zelllinien jedoch nicht durchgehend bestätigen, in Granta-519 war dies nur in der Kombination mit Copanlisib der Fall. In Mino ist ein Synergismus nur in der jeweilig höchsten Konzentration sichtbar. Die duale Kombination von AZD und Copanlisib zeigt lediglich eine additive Wirkung, dies bestätigt sich in allen untersuchten Zelllinien. Ein Wert in Rec-1 der knapp über der Grenze zum Synergismus liegt, ist wohl a.e. als unspezifische Wirkung einzuordnen. Auch in der Kombination von AZD und Idelalisib bzw. Temsirolimus zeigt sich in den Zelllinien Jeko-1 und Mino jeweils ein Synergismus in den höheren Konzentrationen. In Rec-1 ist diese Wirkung zur in der Kombination von AZD mit Idelalisib zu sehen, in Granta-519 nur bei AZD mit Temsirolimus. Erwartungsgemäß bringt eine Kombination von IBL-202 oder IBL-301 mit Idelalisib oder Copanlisib in allen

	Konzentration (in $\mu\text{M}$ )	Fp		Konzentration (in $\mu\text{M}$ )	Fp
<b>IBL-202+Cop</b>	0.125 + 0.15	-0.07	<b>IBL-301+Cop</b>	0.03125 + 0.15	-0.19
	0.25 + 0.3	-0.10		0.0625 + 0.3	-0.17
	0.5 + 0.6	-0.10		0.125 + 0.6	-0.17
<b>IBL-202+Ide</b>	0.125 + 1.25	-0.04	<b>IBL-301+Ide</b>	0.03125 + 1.25	-0.15
	0.25 + 2.5	-0.09		0.0625 + 2.5	-0.05
	0.5 + 5	-0.05		0.125 + 5	-0.01
<b>IBL-202+Tem</b>	0.125 + 0.0025	-0.03	<b>IBL-301+Tem</b>	0.03125 + 0.0025	0.03
	0.25 + 0.005	0.04		0.0625 + 0.005	0.05
	0.5 + 0.01	0.02		0.125 + 0.01	0.09
<b>IBL-202+AZD</b>	0.125 + 1.25	0.11	<b>IBL-301+AZD</b>	0.03125 + 1.25	-0.02
	0.25 + 2.5	0.09		0.0625 + 2.5	-0.04
	0.5 + 5	0.05		0.125 + 5	-0.04
<b>AZD+Cop</b>	1.25 + 0.15	0.04	<b>Tem+Ide+AZD</b>	0.0025 + 1.25 + 1.25	-0.33
	2.5 + 0.3	-0.03		0.005 + 2.5 + 2.5	-0.09
	5 + 0.6	-0.01		0.01 + 5 + 5	0.21
<b>AZD+Ide</b>	1.25 + 1.25	-0.03	<b>Tem+Cop+AZD</b>	0.0025 + 0.15 + 1.25	-0.12
	2.5 + 2.5	0.03		0.005 + 0.3 + 2.5	0.04
	5 + 5	0.10		0.01 + 0.6 + 5	0.11
<b>AZD+Tem</b>	1.25 + 0.0025	-0.07			
	2.5 + 0.005	0.07			
	5 + 0.01	0.22			

Tabelle 3: Fraction of Product nach Webb für Mino

vier Zelllinien keine relevante zusätzliche Veränderung. Die Werte schwanken zwischen einem additiven oder sogar antagonistischen Effekt und zeigen dabei eine Korrelation zur Konzentration - geringere Konzentrationen bringen einen antagonistischen Effekt hervor, höhere einen additiven. Auch die Kombination von IBL-202 mit Temsirolimus zeigt nur eine additive Wirkung. Diese Ergebnisse lassen sich in allen vier Zelllinien bestätigen. Kombiniert man IBL-301 mit Temsirolimus, so ist kein zusätzlicher Effekt zu erwarten welches sich in unserem Versuch bestätigt.

	Konzentration (in $\mu\text{M}$ )	Fp		Konzentration (in $\mu\text{M}$ )	Fp
<b>IBL-202+Cop</b>	0.125 + 0.15	-0.06	<b>IBL-301+Cop</b>	0.03125 + 0.15	-0.15
	0.25 + 0.3	-0.11		0.0625 + 0.3	-0.10
	0.5 + 0.6	-0.07		0.125 + 0.6	-0.05
<b>IBL-202+Ide</b>	0.125 + 1.25	-0.03	<b>IBL-301+Ide</b>	0.03125 + 1.25	-0.22
	0.25 + 2.5	-0.05		0.0625 + 2.5	-0.16
	0.5 + 5	-0.06		0.125 + 5	-0.01
<b>IBL-202+Tem</b>	0.125 + 0.0025	0.11	<b>IBL-301+Tem</b>	0.03125 + 0.0025	0.06
	0.25 + 0.005	-0.02		0.0625 + 0.005	0.03
	0.5 + 0.01	-0.05		0.125 + 0.01	-0.05
<b>IBL-202+AZD</b>	0.125 + 1.25	0.22	<b>IBL-301+AZD</b>	0.03125 + 1.25	0.10
	0.25 + 2.5	0.16		0.0625 + 2.5	0.07
	0.5 + 5	0.05		0.125 + 5	0.03
<b>AZD+Cop</b>	1.25 + 0.15	0.12	<b>Tem+Ide+AZD</b>	0.0025 + 1.25 + 1.25	0.28
	2.5 + 0.3	0.05		0.005 + 2.5 + 2.5	0.03
	5 + 0.6	0.05		0.01 + 5 + 5	-0.08
<b>AZD+Ide</b>	1.25 + 1.25	0.11	<b>Tem+Cop+AZD</b>	0.0025 + 0.15 + 1.25	0.03
	2.5 + 2.5	0.00		0.005 + 0.3 + 2.5	-0.04
	5 + 5	0.15		0.01 + 0.6 + 5	-0.08
<b>AZD+Tem</b>	1.25 + 0.0025	0.07			
	2.5 + 0.005	-0.08			
	5 + 0.01	0.03			

Tabelle 4: Fraction of Product nach Webb für Rec-1

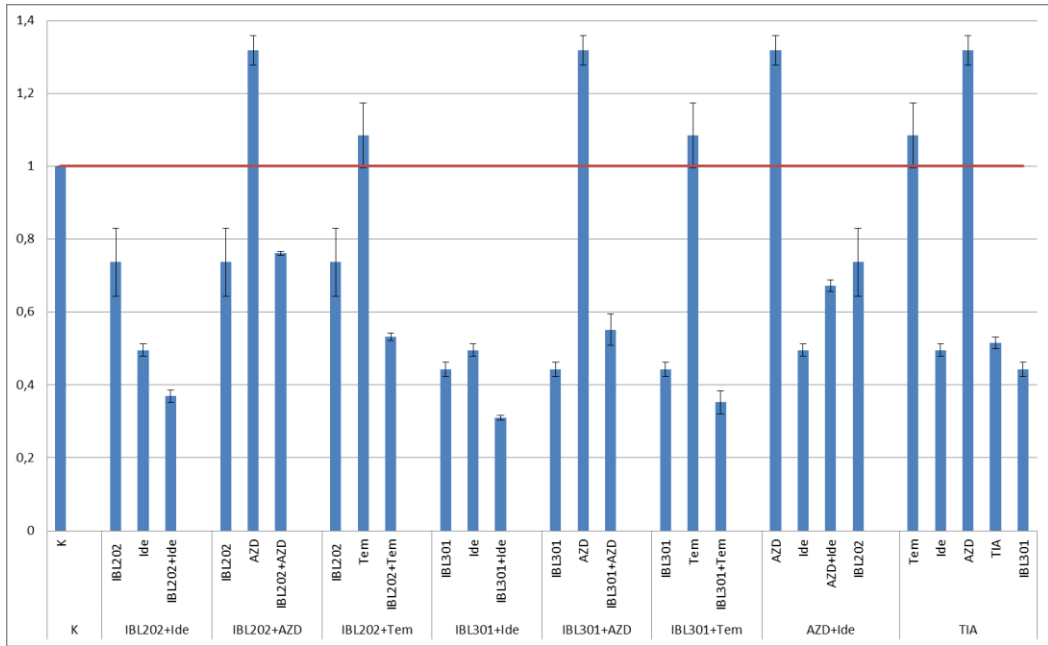


## 4.6 Zell-Viabilitäts Essay mit primären Zellen

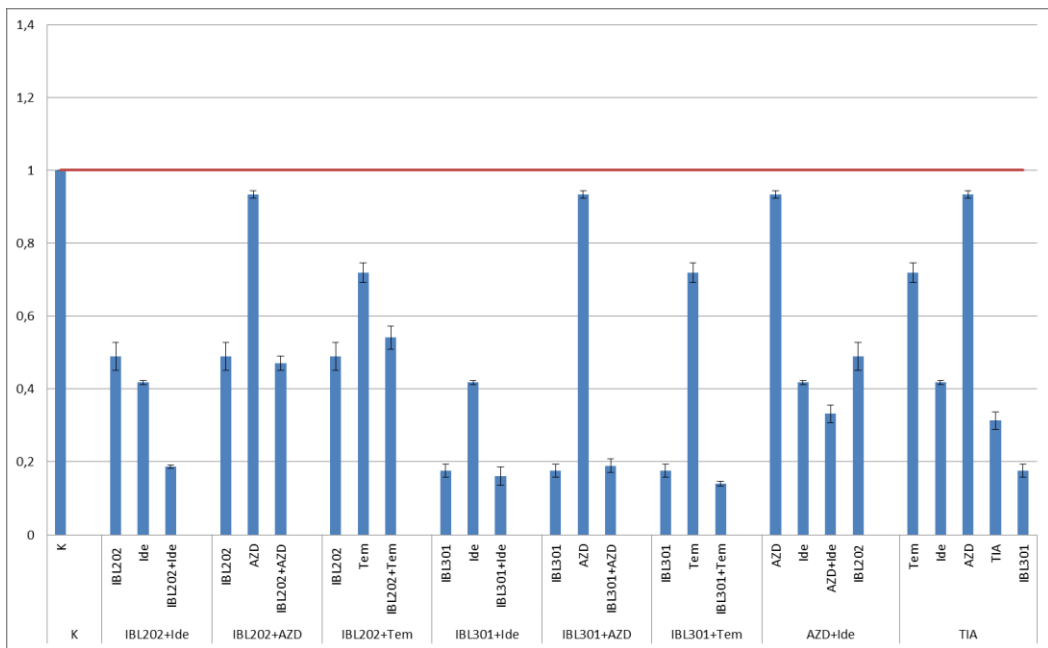
Um den Effekt der verschiedenen Inhibitoren auf primäre Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen zweier Patienten mit nachgewiesener Mantelzellymphom-Erkrankung mit jeweils IBL-202 (62,5µM), IBL-301 (31,25µM), Idelalisib (1,25µM), AZD (2,5µM) und Temsirolimus (0,005µM) sowie mit Kombinationen dieser Inhibitoren inkubiert. Da die bisherigen Ergebnisse anhand MCL-Zelllinien erzielt wurden, erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit die parallele Durchführung des Experimentes mit Zellen der Zelllinien Mino und Jeko-1. Nach 48-stündiger Inkubation mit den jeweils angegebenen Inhibitoren erfolgte die Auswertung mit Hilfe des Zell-Viabilitäts Essays Cell-Titer-Glo®, der das vorhandene ATP in den Proben misst.

Die Abbildungen 17 A-D zeigen die Ergebnisse dieses Versuches. Wenn auch die Ausprägungen der Wirkungen zwischen den beiden Patientenproben sehr unterschiedlich sind, stimmen sie in ihrer Tendenz überein. So werden die primären Zellen durch Inkubation mit IBL-301 jeweils stärker in ihrem Wachstum gehemmt als durch Idelalisib, Temsirolimus oder AZD alleine, IBL-202 zeigt dagegen sogar eine schwächere Wirkung als Idelalisib alleine. Eine Kombination von einer IBL-Substanz mit einer der anderen Single-Inhibitoren bringt nur in Ausnahmefällen eine relevante Effektverstärkung. Am deutlichsten ist diese wohl in der Kombination von IBL-202 mit Idelalisib ausgeprägt, hier kann bei gleichzeitiger Gabe von IBL-202 und Idelalisib eine um etwa 30% stärkere Wachstumshemmung festgestellt werden. Weiterhin verglichen wir die Wirkung von IBL-202, welches eine PIM- sowie eine PI3K-Inhibition beinhaltet, mit der Kombination von AZD und Idelalisib, einem Single-PIM- und PI3K-Inhibitor, welches somit jeweils eine Zusammensetzung gleichartiger Wirkstoffe darstellt. Dasselbe Prinzip verwendeten wir für IBL-301 unter Zunahme von Temsirolimus. Hier zeigt sich bei beiden Patientenproben, dass IBL-202 einen geringfügig schwächeren Effekt hat als AZD+Idelalisib, während IBL-301 stärker als Temsirolimus+AZD+Idelalisib wirkt.

Vergleicht man die Wirkung der Inhibitoren auf die Patientenzellen mit denen auf die Zelllinien Jeko-1 und Mino, so zeigt sich in Mino ebenfalls die Tendenz,



*A Zell-Viabilitäts Essay Cell-Titer-Glo® primärer Zellen einer 78-jährigen Patientin K.M. mit Mantelzelllymphom.*



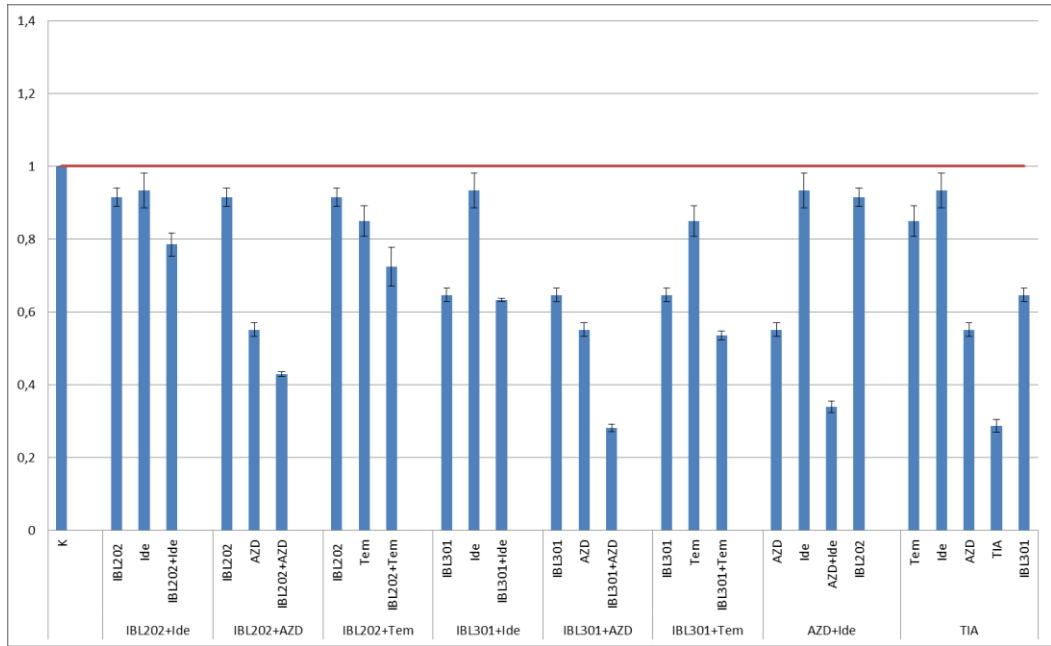
*B Zell-Viabilitäts Essay Cell-Titer-Glo® primärer Zellen eines 61-jährigen Patienten M.P. mit Mantelzelllymphom*

*Abbildung 17 A-D: Zell-Viabilitäts Essay Cell-Titer-Glo® primärer Zellen sowie der Zelllinien Jeko-1 und Mino*

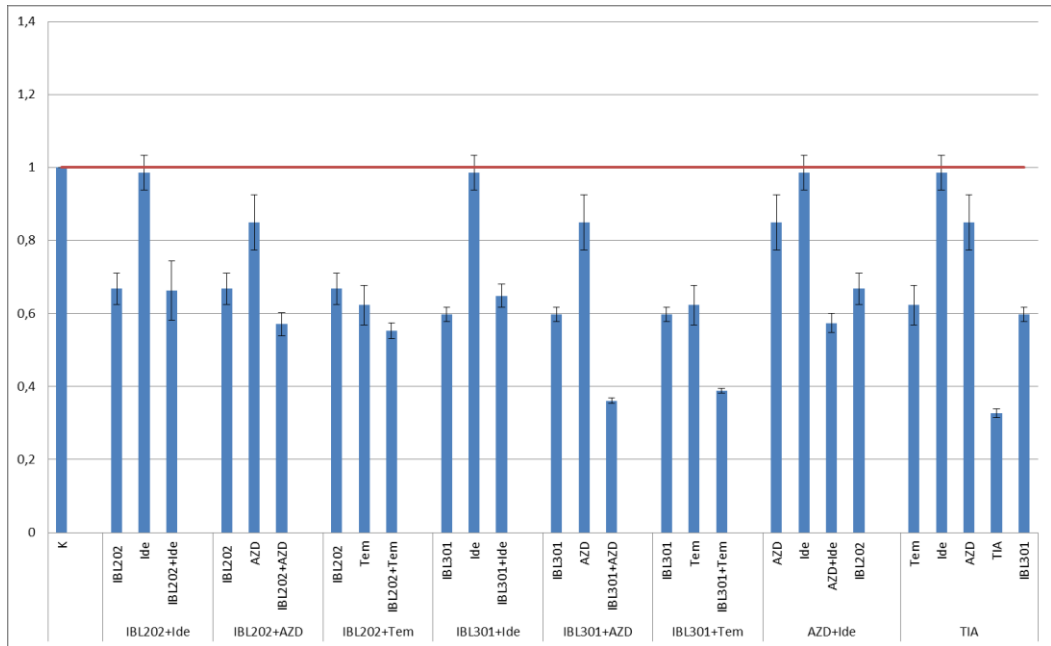
*Die Ergebnisse sind in Relation zur unbehandelten Kontrolle in Prozent dargestellt, durch Inkubation mit den dargestellten Inhibitoren verringert sich die Menge von ATP in dargestellter Weise*

dass die IBL-Substanzen einen stärkeren Einfluss auf das Zellwachstum haben als die übrigen Single-Inhibitoren. Dies steht im Einklang mit den von uns bereits erhobenen Ergebnissen der Zellzahl im Rahmen der dosis- und zeitabhängigen Proliferationshemmung, in welcher Mino als sehr empfindliche Zelllinie gegenüber den IBL-Substanzen auffiel. Temsirolimus bildet hier jedoch die Ausnahme, gegenüber IBL-202 zeigt Temsirolimus eine leicht stärkere Proliferationshemmung. Nach Exposition von Jeko-1 gegenüber den verschiedenen Inhibitoren zeigt Idelalisib im Vergleich zu IBL-202 und IBL-301 eine schwächere Wirkung, AZD ist dagegen ein potenterer Inhibitor. Temsirolimus als Einzelsubstanz hingegen ist effektiver im Vergleich zu IBL-202, jedoch weniger als IBL-301.

Eine wesentliche Effektverstärkung durch Kombination eines IBL-Inhibitors mit einem weiteren Single-Inhibitor erhielten wir v.a. in der Kombination mit AZD und Temsirolimus. Fügten wir hingegen Idelalisib zu der Inkubation von Mino oder Jeko-1 hinzu, konnte keine relevante Wirkverstärkung verzeichnet werden. Verglichen wir die Wirkung von IBL-202 mit der eigenen Kombination eines Pan-PIM-Inhibitors und PI3K-Inhibitors mittels AZD+Idelalisib so konnte hier wie auch bei den primären Zellen jeweils die Kombination der Single-Substanzen den höheren Effekt verbuchen. Dies zeigt sich jedoch im Unterschied zu den primären Zellen auch nach Hinzunahme von Temsirolimus im Vergleich zu IBL-301. Die Ursache für dieses teilweise unterschiedliche Ansprechen zwischen den primären Zellen und den untersuchten Zelllinien ist nicht eindeutig zu differenzieren. Letztlich erfolgten diese Versuche mit den zuvor in den multiplen Vor-Versuchen etablierten, wirkungsvollen Konzentrationen der Inhibitoren. Es ist durchaus denkbar, dass die primären Zellen auf die verschiedenen Substanzen mit anderen Empfindlichkeiten reagieren. Hier wäre die Untersuchung einer dosis- und zeitabhängigen Proliferationshemmung mit den verschiedenen Inhibitoren hilfreich. Die generelle Aussage einer stärkeren Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion durch IBL-301 als IBL-202, welche wir in den in-vitro-Versuchen zuvor nachgewiesen hatten, zeigt sich so auch in den primären Zellen.



C Zell-Viabilitäts Essay Cell-Titer-Glo® der Zelllinie Jeko-1



D Zell-Viabilitäts Essay Cell-Titer-Glo® der Zelllinie Mino

Fortsetzung der Abbildung 15

## 5. Diskussion

In den letzten Jahren sind in dem Fachgebiet der Onkologie Dutzende neue Medikamente auf den Markt gekommen, hierbei handelt es sich jedoch selten mehr um klassische zytostatische Chemotherapien. Sondern vielmehr zielgerichtete Substanzen und Antikörper, die sich spezifisch gegen krankhaft veränderte Strukturen der Tumorzellen richten, während gesundes Gewebe weitgehend geschont bleibt, werden entwickelt und erfolgreich bei verschiedensten Tumorentitäten angewendet. So konnten mit Einführung von Trastuzumab, einem monoklonalem Antikörper gegen den Wachstumsfaktor-Rezeptor Her2/neu, erhebliche Verbesserungen der Überlebensrate bei Patienten mit Her2/neu positivem Mammakarzinom erreicht werden [229]. In der Regel sind Therapien mit zielgerichteten Substanzen besser verträglich für den Patienten und eignen sich daher auch für eine Dauertherapie.

Im Laufe der Jahre konnten auch die Erkenntnisse um die Pathogenese und die molekularen Eigenschaften des Mantelzelllymphoms stetig erweitert werden [40], was die Möglichkeiten neuer spezifischer Therapien eröffnet. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, konnte in Mantelzelllymphomen z.B. eine Dysregulation des PI3K/Akt/mTor-Signalweges [42] entdeckt werden, darüber hinaus zeigen sich erhöhte Proteinlevel der PIM-Kinasen [135]. Somit eignen sich Inhibitoren dieser Moleküle gut für eine zielgerichtete Therapie des Mantelzelllymphoms. In dieser Arbeit untersuchten wir zwei neuartige Inhibitoren auf ihre in vitro Wirksamkeit in ausgesuchten Mantelzelllymphomzelllinien. Diese Inhibitoren bestehen aus einer Kombination von einem PIM-Inhibitor mit einem PI3K-Inhibitor bzw. zusätzlich noch einem mTor-Hemmer. Dass dies ein vielversprechender Ansatz zur Tumorthherapie bietet, zeigen bereits zahlreiche Veröffentlichungen die ähnliche Substanzen an Mantelzelllymphomzelllinien und anderen Tumorentitäten untersuchten.

In dieser Arbeit konnte eine dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung sowie ein relevanter G1-Arrest durch die Inkubation verschiedener Mantelzelllymphomzelllinien mit IBL-202 bzw. IBL-301 gezeigt werden, welches sich in

bereits publizierter Literatur widerspiegelt. Blanco-Aparicio et al. haben 2011 zunächst eine antiproliferative Wirkung des selektiven PIM-1-Inhibitor ETP-45299 in-vitro an 14 verschiedenen Tumorzelllinien u.a. an den Mantelzell-lymphomzelllinien UPN1 und UPN2 gezeigt, in Kombination mit dem PI3K-Inhibitor GDC-0941 erhöhte sich der antiproliferative Effekt um den Faktor 19 [155]. Auch Beharry et al. haben eine Zellproliferationshemmung durch PIM-Inhibition an Leukämiezelllinien zeigen können, bei Kombination von einem PIM-Inhibitor mit Rapamycin fiel dieser Effekt stärker aus [230]. Wurde die Expression von PIM-2 durch RNA-Interferenz künstlich herabreguliert zeigte sich dies in einer Arbeit von Liu et al. in einer verminderten Zellproliferation sowie einem G1-Arrest in verschiedenen Zelllinien von hämatologischen Tumoren sowie NSCLC über die Hochregulation des CDK-Inhibitors p21 [231].

Saurabh et al. führten erste Versuche mit dem Pan-PIM-Inhibitor AZD 1208 an Mäusen mit einem prä-Leukämie Stadium durch. Dieser konnte zwar keine Heilung erreichen, die Lebenserwartung der behandelten Mäuse war jedoch für die Dauer der Therapie signifikant höher sowie die Milzgröße im Schnitt kleiner [91].

Als Multikinaseinhibitoren können IBL-202 und IBL-301 neben den PIM-Kinasen auch den PI3K/Akt/mTor-Signalweg beeinflussen. In dieser Arbeit konnte die Abnahme der phosphorylierten Form der Signalmoleküle wie Akt und GSK-3 $\beta$  nachgewiesen werden, weiterhin ließ sich eine relevante Apoptoseinduktion darlegen. Bereits 2006 veröffentlichten Peponi et al. Untersuchungen zur Inhibition des PI3K/Akt/mTor-Signalweges an den Mantelzelllymphomzelllinien Jeko-1, Z-138 und Mino. Nachdem gezeigt werden konnte, dass dieser Signalweg im Mantelzelllymphom aktiviert ist, führte der unspezifische PI3K-Inhibitor LY294002 zu einer dosis-abhängigen Reduktion von phosphoryliertem Akt, mTor und 4EBP1. Darüber hinaus konnte die mTor Expression mittels *mTOR*-spezifischer siRNA reduziert werden, was ebenfalls zu einer reduzierten Phosphorylierung der mit mTor verbundenen Signalproteinen sowie zu einem Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion führte [232]. Rudelius et al. bestätigten in einer ebenfalls 2006 veröffentlichten Arbeit, dass die Behandlung von Granta-519 und Z-138 mit LY294002 oder einem Akt-Inhibitor zu einer relevan-

ten Proliferationshemmung mittels G1-Arrest und einer Zunahme der Apoptose führt [78].

An CLL-Zelllinien wurde die Kombination einer PI3K/mTor-Inhibition näher untersucht. Blunt et al. haben in einem 2015 veröffentlichten Paper Kombinationsversuche in CLL Zelllinien zwischen Einzelsubstanzen durchgeführt, um diese mit dem dualen PI3K/mTor-Inhibitor PF-04691502 zu vergleichen. Da eine alleinige mTor-Inhibition durch ein positives Feedback über den mTor Komplex 2 einen Wirkungsverlust bedeutet, wird dieser über die duale Hemmung mittels PF-04691502 unterbrochen. Dies bedeutete eine Abnahme der Zellviabilität sowie eine Zunahme der Caspase abhängigen Apoptose. Blunt et al. konnten anhand von Kombinationen verschiedener isospezifischer PI3K-Inhibitoren mit dem mTORC1-Inhibitor Everolimus zeigen, dass die signifikant höhere Wirkung von PF-04691502 gegenüber den Einzelsubstanzen oder der Kombination aller am ehesten auf die gleichzeitige Hemmung von mTORC1, mTORC2 und PI3K $\delta$  zurückzuführen ist [233].

Chen et al. konnten diese Ergebnisse auch an Zelllinien des DLBCL und MCL bestätigen, Granta-519 wurde hierbei von den Autoren als beispielhafte MCL-Zelllinie verwendet. Auch die Zelllinien aggressiver B-Zell Non-Hodgkin Lymphome reagierten mit einer starken Proliferationshemmung auf die duale PI3K/mTor-Inhibition. Eine alleinige Inkubation mit Idelalisib führte ebenfalls zu einer Proliferationshemmung, die mittlere inhibitorische Konzentration lag jedoch deutlich höher und lässt daher auf eine geringere Potenz der Einzelsubstanz schließen. Die Abnahme der Phosphorylierung von Akt konnte unter dualer Inhibition darüber hinaus ebenso nachgewiesen werden wie eine dosisabhängige Apoptoseinduktion und ein Zellzyklusarrest. Unter Hinzunahme von Rituximab ließ sich die Apoptoseinduktion in diesen Zelllinien noch einmal steigern [234].

Zang et al. untersuchten die gleichzeitige PI3K/mTor-Hemmung an DLBCL Zelllinien der GBC und der im Allgemeinen aggressiveren ABC Subtypen. Bei beiden konnte durch die alleinige Hemmung von mTORC1 mittels RAD001 die Proliferation durch einen Zellzyklusarrest blockiert werden, es erwiesen sich

dabei die GBC-Zelllinien als empfindlicher. Es zeigte sich jedoch keine Abnahme der Phosphorylierung von 4EBP1 und es wurde keine Apoptose induziert. Die duale mTORC1 und mTORC2-Inhibition in Kombination mit einer PI3K-Hemmung durch NVP-BEZ235 hemmt hingegen die Proliferation, die Phosphorylierung von 4EBP1 und veranlasst den Zelltod. Auch hier zeigten sich die Zelllinien der aggressiveren Form als weniger sensibel. Es konnte demonstriert werden, dass NVP-BEZ235 in GCB-Zelllinien zu einer Suppression der Translation und Runterregulierung von Mcl-1, einem anti-apoptotischem Protein der Bcl-2 Familie, führt. In den ABC-Zelllinien scheint dieser Mechanismus über NF- $\kappa$ B sowie über PIM-Kinasen kompensiert zu werden [235].

Die Wirkung von NVP-BEZ235 wurde durch Müller et al. auch an den Mantelzelllymphomzelllinien Jeko-1, Mino und Granta-519 untersucht. Rapamycin erbrachte einen zytostatischen Effekt, wohingegen NVP-BEZ235 eine aktive Apoptoseinduktion bewirkte. Unter Behandlung mit NVP-BEZ235 wurden zudem nachfolgende Proteine des PI3K/Akt/mTor-Signalweges beeinflusst, es konnte eine Abnahme der Phosphorylierung von Akt und 4EBP1 beobachtet werden. Dies zeigte sich durch Rapamycin nur vereinzelt. Auch im Mantelzelllymphom spielt Mcl-1 eine wichtige Rolle im Zellüberleben, die Proteinlevel blieben unter Inkubation mit Rapamycin unverändert, wurden durch NVP-BEZ235 jedoch signifikant herunterreguliert [236].

In den dargestellten Arbeiten bestätigen sich viele Aspekte unserer Ergebnisse. So bewies sich IBL-301 mit der zusätzlichen mTor-Inhibition als wirksamer verglichen zu IBL-202 sowohl in Bezug auf die Proliferationshemmung als auch die Apoptoseinduktion. Weiterhin zeigten unsere Kombinationen der Einzelsubstanzen nicht den gleichen Effekt wie die duale bzw. dreifache Inhibition mittels IBL-202 und IBL-301. Da wir mit Temsirolimus als Rapamycin Analogon ebenfalls nur eine mTORC1 Hemmung erreichten, könnte die Durchbrechung des positiven Feedbacks über den mTOR Komplex 2 der Vorteil der Kombinationssubstanzen darstellen. Ebenso könnte dies ein wichtiger Faktor sein, um die Ansprechraten auf Temsirolimus im klinischen Alltag zu verbessern.

Auch die Kombination einer PIM- und mTor-Inhibition wurde in der Literatur



bereits näher untersucht. Harada et al. prüfte an AML-Zelllinien den Effekt einer alleinigen PIM- oder mTor-Hemmung und der Kombination beider zusammen. In jedem Fall zeigte sich eine Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion, welche jedoch bei Verbindung beider Substanzen deutlich stärker ausfiel und in der weiteren Analyse mit synergistischem Effekt ausgezeichnet wurde. Auch die Zielproteine der Kinasen zeigten eine stärkere Abnahme der Phosphorylierung bei Anwendung der Kombination beider Inhibitoren [237].

Einen Synergismus konnten Meja et al. auch zwischen PIM- und Akt-Inhibitoren aufzeigen. Nach Inkubation mit dem pan-PIM-Inhibitor AZD 1897 zeigte sich bei Betrachtung der Proliferationshemmung lediglich eine limitierte Aktivität gegen AML-Zelllinien. In Kombination mit einem Akt-Inhibitor stellte sich jedoch ein deutlicher Synergismus dar [238]. Auch die oben bereits erwähnte Arbeit von Blanco-Aparicio aus dem Jahr 2011 konnte einen relevanten Synergismus bei der simultanen Anwendung von ETP-45299 als selektiven PIM-1 Inhibitor mit einem PI3K-Kinasehemmer nachweisen. Da in vielen Tumoren der PI3K/Akt-Signalweg aktiviert ist und sich viele Downstream Targets mit den PIM-Kinasen überschneiden, kann durch die duale Inhibition ein höherer Wirkungsgrad erreicht werden [155].

Der auch in dieser Arbeit verwendete pan-PIM-Inhibitor AZD1208 ist hoch selektiv für die PIM-Kinasen Familie und zeigte bereits in in-vitro Versuchen eine sehr gute Effektivität gegenüber AML-Zelllinien [166]. Daher wurde im März 2012 eine klinische Phase 1 Studie begonnen. Bei der Therapie von AML Patienten sollte die Pharmakokinetik, Sicherheit und Effektivität festgestellt werden. Es erhielten 67 Patienten eine Therapie mit AZD1208, 32 Patienten hiervon litten an AML, ungefähr zwei Drittel unter einer refraktären AML. Nebenwirkungen traten bei nahezu allen Patienten auf, vor allem gastrointestinaler Art wie Übelkeit und Erbrechen. AZD1208 induzierte eine gesteigerte CYP3A4 Aktivität, sodass bei längerer Applikation die Verstoffwechslung erhöht war. Alle Studienteilnehmer brachen jedoch die Therapie aufgrund fehlendem therapeutischen Ansprechens, schweren Nebenwirkungen oder auf eigenem Wunsch hin ab. In keinem Fall zeigte sich ein klinisches Ansprechen auf die Therapie. Eine Monotherapie mit AZD1208 scheint daher nicht den erwünschten Erfolg zu

bringen, die Kombination mit anderen Substanzen scheint erforderlich zu sein [239].

In der Literatur sind auch bereits Daten veröffentlicht, die auf eine Wirksamkeit der PIM-Kinaseinhibitoren in Kombination mit bereits etablierten Therapien hindeuten. Koblish et al. charakterisierten den pan-PIM-Kinaseinhibitor INCB053914 in seiner Wirkung gegenüber Zelllinien hämatologischer Erkrankungen ebenso wie primären Zellen in Form von Blasten aus dem Knochenmark von Patienten mit AML. Auch hier zeigte sich in der Monotherapie eine Zellproliferationshemmung sowie eine Abnahme der Phosphorylierung nachgeschalteter Zielproteine. Besonders interessant ist jedoch eine additive oder synergistische Inhibition des Tumorwachstums, wird dieser pan-PIM-Inhibitor mit einem selektiven PI3K $\delta$  Inhibitor, JAK1 bzw. JAK1/2 Inhibitor oder Cytarabin kombiniert [240]. Mazzacurati et al. konnten ebenfalls eine signifikante Wirkverstärkung bezüglich einer Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion bei der kombinierten Anwendung von Ruxolitinib und INCB053914 in sowohl in vitro als auch in vivo Modellen myeloproliferativer Erkrankungen beobachten. Diese Effektivitätssteigerung wird durch das Angreifen paralleler und kompensatorischer Signalwege für das Zellüberleben und -wachstum erzielt [241].

Paíno et al. konnten in einer neuen Studie darüber hinaus zeigen, dass eine PIM-Inhibition auch mit anderen, bereits etablierten Therapeutika wie Lenalidomid, Pomalidomid oder Dexamethason in Zelllinien des Multiplen Myelom einen relevanten Synergismus vorweist. Auch die dreifache Kombination mit Bortezomid, Lenalidomid oder Pomalidomid plus Dexamethason und PIM-Inhibition weist einen starken Synergismus auf. In dieser Studie wurde weiterhin auch die dosisabhängige Potenz des Single-PIM-Inhibitors aufgezeigt, der eine Apoptose-Induktion sowie einen Zellzyklusarrest bewirkt [242].

Kuo et al. zeigten in einer Arbeit von 2016 auf, dass Punktmutationen in *PIM-1* in den aggressiveren ABC-DLBCL zu einer verringerten Sensitivität gegenüber der Therapie mit dem Bruton-Tyrosinkinaseinhibitor Ibrutinib führt. Die Kombinationstherapie von Ibrutinib mit einem pan-PIM-Inhibitor zeigte eine synergis-

tische Wirkung und führte *in vitro* zu einer Hemmung des Zellwachstums der DLBCL-Zelllinien, *in vivo* zudem zu einem verringertem Tumorwachstum. Der zusätzliche Effekt wird durch die Unterbindung der Hochregulation von PIM-1 erreicht [243].

Auch in soliden Tumoren konnte eine Wirksamkeit von PIM-Inhibitoren bereits alleine oder in Kombination mit anderen Substanzen gezeigt werden. Mologni et al. untersuchten den Effekt des PIM-1 Inhibitors NMS-P645 auf Prostatakarzinomzelllinien. In der alleinigen Behandlung mit diesem konnte eine zuvor beobachtete Taxan-Resistenz rückgängig gemacht werden, jedoch ohne starken antitumörosen Effekt. In Kombination mit einem PI3K-Inhibitor stellte sich dagegen eine relevante antiproliferative Wirkung auf die Prostatakarzinomzellen dar [244]. Mumenthaler et al. zeigten für den pan-PIM-Inhibitor SGI-1776 auch in der alleinigen Anwendung eine relevante Reduktion von Zellviabilität sowie einen G1-Arrest und Apoptose-Induktion in Prostatakarzinomzellen *in vitro* [245]. Eine PIM-Inhibition konnte ebenfalls in Zelllinien des Nierenzellkarzinoms eine Apoptose-Induktion bewirken, in Kombination mit dem Rezeptor-Tyrosinkinasehemmer Sunitinib *in vivo* eine Reduktion der Tumorlast und der Viabilität der Tumorzellen [246]. Eine indirekte Hemmung von PIM-1 führten Hu et al. an Prostatakarzinomzelllinien durch, indem sie einen Antikörper gegen PIM-1 synthetisierten und somit eine Hemmung der Kinase erreichten. In diesem Ansatz konnte eine Abnahme der Phosphorylierung u.a. von Akt sowie eine Apoptose-Induktion beobachtet werden. Als Apoptose Marker wurde wie in unserem Ansatz u.a. Caspase 9 verwendet [247].

Luszczak et al. verwendeten mit AUM302 bzw. zuvor IBL-302 genannt, ebenfalls einen Multikinaseinhibitor zur PIM/PI3K/mTor-Inhibition und untersuchten die Effekte dessen auf Prostatakarzinomzelllinien. Diese Ergebnisse wurden mit der alleinigen PIM-Kinasen und PI3K/mTor-Hemmung verglichen. Es konnte eine dosisabhängige Proliferationshemmung dokumentiert werden, welche in den mit dem Multikinaseinhibitor behandelten Zellen stärker ausfiel. In der Kombination der PIM- und PI3K/mTor Hemmung zeigte sich zudem eine effektivere Beeinflussung der Zielproteine des PI3K/Akt/mTor-Signalweges [248]. Dies steht im Einklang mit unseren Ergebnissen, die gleichzeitige Kombination der

PIM-Kinasen-, PI3K- und mTor-Inhibition erwies sich als deutlich wirksamer in der Proliferations- und Phosphorylierungshemmung in den untersuchten Mantelzelllymphomzelllinien.

In der Literatur sind auch bereits erste Daten zu den hier verwendeten neuartigen Kinaseinhibitoren IBL-202 und IBL-301 veröffentlicht. Crassini et al. untersuchten die Wirkung von IBL-202 auf CLL-Zelllinien und Patientenproben. Zuvor bestätigten sie in dieser Arbeit einen Synergismus zwischen einem pan-PIM-Hemmer und Idelalisib als PI3K $\delta$ -Inhibitor. Weiterführend wurde IBL-202 unter Bedingungen geprüft, welche das Tumormikromilieu in Lymphknoten und Hypoxie der CLL-Zellen in vivo widerspiegelt. CLL-Zellen von Patienten wurden unter normalen und hypoxischen Bedingungen kultiviert, es zeigte sich eine höhere und dosisabhängige Wirksamkeit von IBL-202 bei Hypoxie, auch im Vergleich zu Idelalisib. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass IBL-202 in CLL-Zellen die Zellzyklusprogression verhindert, sowie die nahezu vollständige Abnahme der Phosphorylierung von Akt bewirkt [249]. Eine weiterführende Arbeit von Shen et al. wurde 2020 veröffentlicht und führt einen synergistischen Effekt von IBL-202 und Venetoclax in CLL-Zellen ebenfalls unter in vitro Bedingungen welche das Tumormikromilieu widerspiegeln aus. Im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie ist bei kombinierter Anwendung von IBL-202 und Venetoclax jeweils eine geringere Dosis notwendig um Apoptose in den Zellen zu induzieren. Weiterhin konnte anhand verminderter Phosphorylierung der Zielproteine eine Herunterregulation der PI3K/Akt- und PIM-Signalwege nachgewiesen werden. Auch ließ sich ein Zellzyklusarrest dokumentieren. Der Synergismus zwischen IBL-202 und Venetoclax folgt aus der Inhibition von Schlüsselsignalwegen, welche die Pathogenität beeinflussen und das Überleben der Zellen im Tumormikromilieu sicherstellen. Somit stellt dies eine mögliche hocheffektive Behandlungsoption für CLL-Patienten dar [250].

Weiterhin wurden von Gifford et al. die Auswirkungen von IBL-202 mono sowie in Kombination mit dem Bcl-2 Inhibitor Venetoclax auf DLBCL Zelllinien analysiert. IBL-202 erzielte in allen verwendeten Zelllinien einen zytotoxischen Effekt, die Wirkung von Venetoclax hingegen variierte stark zwischen den Zelllinien. Folgende Untersuchungen zeigten, dass die Sensitivität der Zellen auf IBL-202

und Venetoclax mit mRNA- und Proteinexpression der PI3K- und Bcl-2-Signalwege korrelieren, welche die Zielstrukturen der Inhibitoren darstellen. Bei der kombinierten Anwendung von IBL-202 und Venetoclax zeigte sich eine signifikante Reduktion der viablen Zellen in 3 der 4 untersuchten Zelllinien im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie, es konnte ein relevanter Synergismus nachgewiesen werden [251].

Mohlin et al. untersuchten die Wirkung sowohl von IBL-202 und IBL-301 als auch des PIM/PI3K/mTor-Multikinaseinhibitors IBL-302 an Zelllinien des Neuroblastoms. IBL-302 zeichnet sich hierbei mit verbesserter Bioverfügbarkeit gegenüber IBL-301 aus. Zuvor wurden die Zellen des Neuroblastom aus 707 Zelllinien von 47 verschiedenen Tumorentitäten als die Sensibelsten gegenüber IBL-302 identifiziert. IBL-202 und IBL-301 regulierten die Phosphorylierung der Zielproteine insbesondere von Akt und PRAS40 herunter, weiterhin konnte eine mittels Caspase 3 vermittelte Apoptoseinduktion nachgewiesen werden. Wie in unserer Arbeit bewies sich IBL-301 als potenterer Inhibitor verglichen zu IBL-202. Im Vergleich zu Single-Inhibitoren gegen PI3K, mTORC1/2 oder PIM-Kinasen zeigte sich zudem eine deutliche Überlegenheit der kombinierten Hemmung durch IBL-302. Darüber hinaus ließ sich ein Synergismus zwischen dem etablierten Chemotherapeutikum Cisplatin und IBL-202 bzw. IBL-301 bezogen auf die Zellviabilität sowohl in vitro als auch an PDX-Modellen in vivo nachweisen [216]. IBL-302 bewies auch in Mammakarzinomzelllinien einen relevanten antitumorösen Effekt und konnte in Her2/neu positiven Tumoren in Kombination mit Trastuzumab den antiproliferativen Effekt deutlich verbessern [252].

Eine aktuelle Studie, welche den Effekt von IBL-301 auf NSCLC beobachtete, wurde 2021 von Moore et al veröffentlicht. Der PI3K/Akt/mTor-Signalweg ist in 50-70% der NSCLC aktiviert, zudem konnte gezeigt werden, dass in den verwendeten Zelllinien PIM-Kinasen exprimiert werden. Es wurde der Effekt des Multikinaseinhibitors IBL-301 auf die Zellviabilität mit der Wirkung eines pan-PIM-Inhibitor und eines pan-PI3K-Inhibitor verglichen, die gewählten Dosierungen von IBL-301 lagen jeweils im nanomolaren Bereich und stehen somit im Einklang mit den in dieser Arbeit gewählten Dosierungen. Beide Zelllinien waren sensibler auf die Behandlung mit IBL-301 und dem pan-PI3K-Inhibitor als

auf die pan-PIM-Hemmung, detektiert durch die Viabilitätsmessung mittels Cell-Titer Glo® wie er ebenfalls in unserer Arbeit angewandt wurde. Weiterhin wurde der Effekt auf die intrazellulären Signalwege untersucht, IBL-301 hatte Einfluss auf die Phosphorylierung unter anderem bei Akt an den Phosphorylierungsstufen Thr308 und Ser473, Bad, GSK-3b, 4EBP1 (Thr37/46) und eIF4B. Auch hier übertrifft die Höhe der Phosphorylierungsabnahme unter IBL-301 die der anderen Inhibitoren in den meisten Proteinen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation der Zelllinien mit IBL-301 die Expression der PIM-1 Isoformen unterschiedlich beeinflusst wird. Während die größere Isoform PIM-1L zu den gemessenen Zeitpunkten 2h, 6h und 24h nach Inkubation jeweils herunter reguliert wird, erfährt die kleinere Isoform PIM-1S vor allem zu den Zeitpunkten 2h und 6h eine relevante Hochregulation. H1975GR, eine PI3K-mTor-resistente Zelllinie, zeigte eine vermehrte Expression von PIM-1L verglichen zu der Ursprungszelllinie H1975P aus welcher diese gewonnen wurden. Nach Inkubation von H1975GR und H1975P mit IBL-301, zeigte sich eine stärkere Zellproliferationshemmung in H1975GR. Dies kann insbesondere bei Patienten welche eine Resistenz gegenüber PI3K/mTor-Inhibitoren entwickeln, zukünftig eine neue Therapieoption darstellen [253].

Abschließend lässt sich hervorheben, dass die kombinierte Inhibition von PIM-Kinasen und des PI3K/Akt/mTor-Signalweges nicht nur für hämatonkologische Tumore sondern auch für solide Tumore insbesondere in Kombination mit bereits etablierten Substanzen eine effektive Therapieoption darstellt. Dass dies ein vielversprechender zukünftiger Therapieansatz ist, zeigen nicht nur die vielen Veröffentlichungen zu diesem Thema, auch die aussichtsvollen Ergebnisse sollten Anlass für weiterführende Forschung hierzu sein.

## 6. Ausblick

PIM-Kinasen stellen in der Onkologie neue, relevante Zielstrukturen dar, deren genaue Bedeutung noch nicht abschließend geklärt ist. Sie werden in vielen Tumorentitäten überexprimiert und sind dabei mit schnellerem Tumorwachstum assoziiert, was sie als ideale Zielstruktur für spezifische Therapien auszeichnet. In welcher Form die Behandlung mit PIM-Kinasen am effektivsten ist, konnte letztlich noch nicht klar definiert werden, jedoch zeigte sich in einigen bereits veröffentlichten Arbeiten eine klare Überlegenheit kombiniert man die Therapie der PIM-Kinasen mit anderen Wirkstoffen oder auch bereits etablierten Therapien wie Bortezomib [242] oder Ibrutinib [243]. Hierdurch konnten auch Resistenzen gegenüber bewährte Medikamente wieder aufgehoben werden [244]. Ob es Tumorzellen jedoch möglich ist, über andere Signalwege selbst eine Resistenz gegenüber PIM-Kinasen zu erlangen oder welche relevanten Nebenwirkungen beim Menschen - insbesondere in der Kombination mit anderen Wirkstoffen - auftreten muss noch in weiteren Studien untersucht werden. Für die Frage, welche Patienten tatsächlich von einer Therapie mit PIM-Kinasen profitieren, wäre die Bestimmung bzw. Identifizierung eines eigenen Biomarkers erstrebenswert.

Aktuell laufen bereits einige Phase I und Phase II Studien mit PIM-Inhibitoren, als Einzelsubstanz oder auch in Kombination mit anderen Substanzen. Der selektive pan-PIM-Inhibitor LGH447 wird im Rahmen einer multizentrischen, Phase I Studie mit Patienten mit akuter myeloischer Leukämie oder einem myelodysplastischem Syndrom mit Hochrisikoprofil auf sein Sicherheitsprofil getestet. In dieser nicht-randomisierten Studie wird die Monotherapie mit LGH447 verglichen mit der Kombination von LGH447 mit Midostaurin bezüglich der Inzidenz dosislimitierender Ereignisse. Ergebnisse aus dieser Studie liegen bislang nicht vor [254]. LGH447 ist ebenfalls Teil einer Phase Ib/II Studie mit dem primären Endpunkt der Dosisfindung der maximal verträglichen Dosis und schließlich in der Kombination mit dem PI3K $\alpha$ -Inhibitor BYL719 bei Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem Multiplen Myelom [255].

Die aktuell laufenden Studien werden sicherlich zeitnah erste Ergebnisse präsentieren, in Abhängigkeit von den Ergebnissen werden zweifelsohne weitere Ausarbeitungen erfolgen. Unsere Arbeit stellt den aussichtsvollen Ansatz der dualen bzw. dreifachen Kombination mit PI3K- bzw. mTor-Inhibitoren dar und zeigt eine bedeutsame Wirksamkeit in Mantelzelllymphomzelllinien. Die PIM-Kinasen und ihre Inhibitoren stellen damit die Grundlage für eine vielversprechende Klasse von neuen, spezifischen Wirkstoffen dar, die einen Schritt weiter in der Hoffnung auf eine Heilung der malignen Erkrankungen darstellt.



## 7. Zusammenfassung

Das Mantelzelllymphom stellt eine eigenständige Entität der B-Zell Non-Hodgkin Lymphome dar und charakterisiert sich auf molekulargenetischer Ebene insbesondere durch die Translokation von t(11;14), wodurch es zu einer Überexpression von Cyclin D1 kommt [4]. Es konnten jedoch auch erhöhte Proteinlevel von PIM-Kinasen nachgewiesen werden [135], einer Familie von Serin/Threonin-Kinasen, welche an wichtigen Zellfunktionen u.a. an der Zellproliferation [126], Apoptose [120] und Zellzyklus [114] beteiligt sind. PIM-Kinase Inhibitoren zeigten sich in Studien bereits wirksam in der Hemmung der Zellproliferation in hämatologischen Erkrankungen [160], [159], in vitro konnte dem pan-PIM-Inhibitor AZD 1208 ein Zellzyklusarrest, Apoptoseinduktion und eine dosis-abhängige Phosphorylierungshemmung nachgewiesen werden [166].

In dieser Arbeit wurden die neuartigen Kombinationsinhibitoren IBL-202 und IBL-301 an etablierten Mantelzelllymphomzelllinien hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Zellproliferation, den Zellzyklus, der Apoptoseinduktion sowie der Proteinexpression bzw. Proteinphosphorylierung untersucht. IBL-202 ist eine Kombination einer PIM-Kinasen- und PI3K-Hemmung, IBL-301 inhibiert zusätzlich mTor.

Wir konnten eine deutliche dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung durch IBL-202 und IBL-301 zeigen, wobei ein erheblich größerer Effekt durch die Behandlung mit IBL-301 erreicht werden konnte. Weiterhin ließ sich nach Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren ein G1-Arrest feststellen, was eine Dysregulation des Zellzyklus bestätigte. Beide Inhibitoren induzierten zudem in den untersuchten Zelllinien dosis- und zeitabhängig Apoptose, mit stärkerer Wirkung durch IBL-301. Auf molekularbiologischer Ebene zeigte sich der Effekt der Multikinaseinhibitoren in einer Abnahme der Phosphorylierung einiger Signalproteine, beispielhaft nimmt in der Zelllinie Granta-519 die Phosphorylierung von Akt, GSK-3 $\beta$  und 4E-BP1 (Ser65) ab. Ein Wirkungssynergismus bei Kombination von verschiedenen Einzelsubstanzen wie in den Kombinationsinhibitoren vorhanden war dosisabhängig und zeigte zwischen den verschiedenen

Zelllinien große Unterschiede. Die potentere Wirkung von IBL-301 gegenüber IBL-202 bestätigte sich nach Inkubation mit primären Zellen von Patientenproben, hier ließ sich im Zell-Viabilitätssassay eine deutlichere Wachstumshemmung feststellen, auch im Vergleich zu den Einzelsubstanzen.

Wir konnten mit dieser Arbeit zeigen, dass PIM-Kinasen Inhibitoren in Kombination mit PI3K- und mTor-Hemmung *in vitro* eine effektive Hemmung der Zellproliferation darstellen, welche mit einem Zellzyklusarrest, Apoptoseinduktion und Beeinflussung der Proteinexpression und Proteinphosphorylierung einhergeht. Dies ließ sich ebenfalls auf primäre Zellen aus Patientenproben übertragen.

Die PIM-Kinasen konnten somit als relevante Zielstruktur identifiziert werden, deren Inhibition eine neue Klasse von Wirkstoffen darstellt. Es laufen bereits vielversprechende erste klinische Studien mit pan-PIM-Inhibitoren und Patienten mit hämatologischen Erkrankungen [239].

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Interaktionen zwischen den Zellzyklusproteinen am Übergang von der G1 zur S-Phase .....	6
Abbildung 2: Therapiealgorithmus für das Mantelzelllymphom .....	13
Abbildung 3: Genloci, mRNA-Transkripte und Proteinisoformen der PIM-Kinase .....	14
Abbildung 4: Regulierung der PIM-Kinasen Proteinbiosynthese und ihre nachgeschalteten Substratproteine.....	18
Abbildung 5: Die Kinase Akt und ihre Substrate.....	25
Abbildung 6: Das Signalnetzwerk um mTor. ....	26
Abbildung 7: IC50 von IBL-202 und IBL-301 sowie die chemische Struktur von IBL-301 .....	31
Abbildung 8: Dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung durch IBL-202... ..	47
Abbildung 9: Dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung durch IBL-301 .....	48
Abbildung 10: Darstellung der Proliferationshemmung in Mino.....	50
Abbildung 11: Darstellung der Proliferationshemmung in allen 6 Zelllinien für die Konzentration von 1µM IBL-202 bzw. IBL-301 .....	51
Abbildung 12 A-D: Zellzyklus-Analyse der Zelllinien Jeko-1, Rec-1, Granta-519 und Mino .....	54
Abbildung 13 A-D: Zellzyklus-Analyse der Zelllinien Jeko-1, Rec-1, Granta-519 und Mino .....	57
Abbildung 14 A-D: Die spezifischen Apoptoseraten nach Zelllinie .....	60
Abbildung 15: Western Blot Analysen mit den Zelllinien Jeko-1 und Granta-519 .....	62
Abbildung 16: Western Blot Analysen mit den Zelllinien Mino und Rec-1 .....	63
Abbildung 17 A-D: Zell-Viabilitäts Essay Cell-Titer-Glo® primärer Zellen sowie der Zelllinien Jeko-1 und Mino .....	72

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fraction of Product nach Webb für Jeko-1 .....	67
Tabelle 2: Fraction of Product nach Webb für Granta-519 .....	68
Tabelle 3: Fraction of Product nach Webb für Mino .....	69
Tabelle 4: Fraction of Product nach Webb für Rec-1 .....	70

## 10. Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	engl. eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
Abb.	Abbildung
ABC-DLBCL	engl. Activated B-cell diffus large B-cell lymphoma, Subtyp des diffus großzelligen B-Zell-Lymphom
Abl	Abelson Kinase
ADP	Adenosindiphosphat
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
ASK1	engl. Apoptosis signaling kinase 1
ASZT	autologe Stammzelltransplantation
AZ	Allgemeinzustand
Bad	engl. Bcl-2 promoted death promoter
bzw.	beziehungsweise
Cal	Idelalisib
CAR	engl. Chimeric antigen receptor
CD	engl. Cluster of differentiation
Cdc25A	engl. M-phase inducer phosphatase 1
CDK	engl. cytokine-dependent kinase
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
Cop	Copanlisib
CR	engl. complete response, Vollremission
DLBCL	engl. diffus large B-cell lymphoma, diffus großzelliges B-Zell Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECOG	engl. Index der Eastern Co-operative of Oncology Group
elf4E	engl. eukaryotic translation initiation factor 4E
FACS	engl. fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FKS	Fetales Kälber Serum
FL	Follikuläres Lymphom
Flt	Fms-like tyrosine kinase

g	Gramm
GBC-DLBCL	engl. Germinal center B-cell diffus large B-cell lymphoma, Subtyp des diffus großzelligen B-Zell-Lymphom
G-CSF	engl. Granulocyte colony-stimulating factor
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	engl. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GSK	Glykogensynthase-Kinase
h	Stunde/n
HDT	Hochdosistherapie
HiDAC	engl. High-dose cytarabine, Hochdosis-Cytarabintherapie
HIF	engl. Hypoxia-inducible factor
Hsp	engl. Heat shock protein, Hitzeschockprotein
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
Ide	Idelalisib
Ig	Immunglobulin
IGHV	engl. Immunglobulin Heavy Chain Gene, Genlokus der schweren Immunglobulinkette
IL	Interleukin
IMDM	engl. Isocove's Modified Dulbecco's Medium
JAK	Janus-Kinase
KLF	engl. Krüppel-like factor
LDH	Laktatdehydrogenase
mA	Milliampere
MAX	engl. myc-associated factor X
MCL	Mantelzelllymphom
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
Mdm2	engl. Mouse double minute 2 homolog
min	Minute/n
MIP1	engl. Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index
ml	Milliliter
mRNA	engl. messenger Ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
mTor	engl. mechanistic (früher mammalian) Target of Rapamycin
mTORC	engl. mammalian target of rapamycin complex
NFAT	engl. nuclear factor of activated T-cells
NFATc1	engl. nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1

NF-κB	engl. Transkriptionsfaktor nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
nM	Nanomol
nm	Nanometer
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
NSCLC	engl. non-small cell lung cancer, Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom
NuMa	engl. Nuclear mitotic apparatus protein
PARP	Poly(ADP-ribose) Polymerase 1
PBS	engl. Phosphate Buffered Saline
PDK	engl. Phosphoinositide-dependent kinase
PDX	engl. Patient derived xenograft
PIM	engl. proviral insertion in murine lymphoma
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol (3,4,5) -trisphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PR	engl. partial response, partielles Ansprechen
PRAS40	engl. proline-rich Akt Substrate of 40kDa
PTEN	engl. Phosphatase and Tensin homolog
Rb	Retinoblastom
R-CHOP	Immunochemotherapie mit den Substanzen Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	engl. revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
Tem	Temsirolimus
Thr	Threonin
Ser	Serin
siRNA	engl. small interfering Ribonucleic acid
SOCS	engl. Suppressor of Cytokine Signaling
STAT	engl. Signal Transducers and Activators of Transcription
UTR	engl. untranslated region, untranslatierter Bereich
V	Volt
vs	versus

## 11. Literaturverzeichnis

- [1] Campo, E., Swerdlow, S.H., Harris, N.L., Pileri, S., Stein, H., and Jaffe, E.S. (2011) The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 117 (19), 5019–5032.
- [2] Leroux, D., Le Marc'Hadour, F., Gressin, R., Jacob, M.C., Keddari, E., Monteil, M., et al. (1991) Non-Hodgkin's lymphomas with t(11;14)(q13;q32): a subset of mantle zone/intermediate lymphocytic lymphoma? *British Journal of Haematology*. 77 (3), 346–353.
- [3] Raffeld, M. and Jaffe, E.S. (1991) bcl-1, t(11;14), and mantle cell-derived lymphomas [editorial]. *Blood*. 78 (2), 259–263.
- [4] Pérez-Galán, P., Dreyling, M., and Wiestner, A. (2011) Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*. 117 (1), 26–38.
- [5] Belaud-Rotureau, M.-A., Parrens, M., Dubus, P., Garroste, J.-C., de Mascarel, A., and Merlio, J.-P. (2002) A Comparative Analysis of FISH, RT-PCR, PCR, and Immunohistochemistry for the Diagnosis of Mantle Cell Lymphomas. *Modern Pathology*. 15 (5), 517–525.
- [6] Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., et al. (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group [see comments]. *Blood*. 84 (5), 1361–1392.
- [7] Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., et al. (2016) The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 127 (20), 2375–2390.
- [8] Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997) A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*. 89 (11), 3909–3918.
- [9] Sant, M., Allemani, C., Tereanu, C., De Angelis, R., Capocaccia, R., Visser, O., et al. (2010) Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 116 (19), 3724–3734.
- [10] Zhou, Y., Wang, H., Fang, W., Romaguer, J.E., Zhang, Y., Delasalle, K.B., et al. (2008) Incidence trends of mantle cell lymphoma in the United States between 1992 and 2004. *Cancer*. 113 (4), 791–798.
- [11] Weisenburger, D.D. and Armitage, J.O. (1996) Mantle cell lymphoma--an entity comes of age. *Blood*. 87 (11), 4483–4494.
- [12] Pileri, S.A., Ascani, S., Sabattini, E., Fraternali-Orcioni, G., Poggi, S., Piccioli, M., et al. (2000) The pathologist's view point. Part II --aggressive lymphomas. *Haematologica*. 85 (12), 1308–1321.
- [13] Bernard, M., Gressin, R., Lefrère, F., Drénou, B., Branger, B., Caulet-Maugendre, S., et al. (2001) Blastic variant of mantle cell lymphoma: a rare but highly aggressive subtype. *Leukemia*. 15 (11), 1785–1791.
- [14] Majlis, A., Pugh, W.C., Rodriguez, M.A., Benedict, W.F., and Cabanillas, F. (1997) Mantle cell lymphoma: correlation of clinical outcome and biologic features with three histologic variants. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*.



- 15 (4), 1664–1671.
- [15] Hsu, P., Yang, T., Sheikh-Fayyaz, S., Brody, J., Bandovic, J., Roy, S., et al. (2014) Mantle cell lymphoma with in situ or mantle zone growth pattern: a study of five cases and review of literature. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 7 (3), 1042–1050.
- [16] Swerdlow, S.H., Habeshaw, J.A., Murray, L.J., Dhaliwal, H.S., Lister, T.A., and Stansfeld, A.G. (1983) Centrocytic lymphoma: a distinct clinicopathologic and immunologic entity. A multiparameter study of 18 cases at diagnosis and relapse. *The American Journal of Pathology*. 113 (2), 181–197.
- [17] Bertoni, F., Zucca, E., and Cotter, F.E. (2004) Molecular basis of mantle cell lymphoma. *British Journal of Haematology*. 124 (2), 130–140.
- [18] Swerdlow, S.H. and Williams, M.E. (2002) From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades. *Human Pathology*. 33 (1), 7–20.
- [19] Salaverria, I., Perez-Galan, P., Colomer, D., and Campo, E. (2006) Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Haematologica*. 91 (1), 11–16.
- [20] Williams, M.E. and Swerdlow, S.H. (1994) Cyclin D1 overexpression in non-Hodgkin's lymphoma with chromosome 11 bcl-1 rearrangement. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 5 Suppl 1 71–73.
- [21] Williams, M.E., Swerdlow, S.H., Rosenberg, C.L., and Arnold, A. (1992) Characterization of chromosome 11 translocation breakpoints at the bcl-1 and PRAD1 loci in centrocytic lymphoma. *Cancer Research*. 52 (19 Suppl), 5541s–5544s.
- [22] Arnold, A., Kim, H.G., Gaz, R.D., Eddy, R.L., Fukushima, Y., Byers, M.G., et al. (1989) Molecular cloning and chromosomal mapping of DNA rearranged with the parathyroid hormone gene in a parathyroid adenoma. *Journal of Clinical Investigation*. 83 (6), 2034–2040.
- [23] Rosenberg, C.L., Wong, E., Petty, E.M., Bale, A.E., Tsujimoto, Y., Harris, N.L., et al. (1991) PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88 (21), 9638–9642.
- [24] Inaba, T., Matsushime, H., Valentine, M., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Look, A.T. (1992) Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics*. 13 (3), 565–574.
- [25] Ewen, M.E., Sluss, H.K., Sherr, C.J., Matsushime, H., Kato, J., and Livingston, D.M. (1993) Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell*. 73 (3), 487–497.
- [26] Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M.J., Pagano, M., and Draetta, G. (1993) Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes & Development*. 7 (5), 812–821.
- [27] Hunter, T. and Pines, J. (1994) Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*. 79 (4), 573–582.
- [28] Rosenwald, A., Wright, G., Wiestner, A., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., et al. (2003) The proliferation gene expression signature is a

- quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell*. 3 (2), 185–197.
- [29] Wiestner, A., Tehrani, M., Chiorazzi, M., Wright, G., Gibellini, F., Nakayama, K., et al. (2007) Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood*. 109 (11), 4599–4606.
- [30] Fu, K., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Dave, S., Wright, G., Rosenwald, A., et al. (2005) Cyclin D1–negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*. 106 (13), 4315–4321.
- [31] Mozos, A., Royo, C., Hartmann, E., De Jong, D., Baró, C., Valera, A., et al. (2009) SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica*. 94 (11), 1555–1562.
- [32] Pinyol, M., Cobo, F., Bea, S., Jares, P., Nayach, I., Fernandez, P.L., et al. (1998) p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*. 91 (8), 2977–2984.
- [33] Pinyol, M., Hernández, L., Martínez, A., Cobo, F., Hernández, S., Beà, S., et al. (2000) INK4a/ARF Locus Alterations in Human Non-Hodgkin's Lymphomas Mainly Occur in Tumors with Wild-Type p53 Gene. *The American Journal of Pathology*. 156 (6), 1987–1996.
- [34] Chiarle, R., Budel, L.M., Skolnik, J., Frizzera, G., Chilosi, M., Corato, A., et al. (2000) Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood*. 95 (2), 619–626.
- [35] Schaffner, C., Idler, I., Stilgenbauer, S., Döhner, H., and Lichter, P. (2000) Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97 (6), 2773–2778.
- [36] Lavin, M.F., Concannon, P., and Gatti, R.A. (1999) Eighth International Workshop on Ataxia-Telangiectasia (ATW8). *Cancer Research*. 59 (15), 3845–3849.
- [37] Liao, M.-J. and Van Dyke, T. (1999) Critical role for Atm in suppressing V(D)J recombination-driven thymic lymphoma. *Genes & Development*. 13 (10), 1246–1250.
- [38] Kong, Q. and Maizels, N. (2001) DNA breaks in hypermutating immunoglobulin genes: evidence for a break-and-repair pathway of somatic hypermutation. *Genetics*. 158 (1), 369–378.
- [39] Bentz, M., Plesch, A., Bullinger, L., Stilgenbauer, S., Ott, G., Müller-Hermelink, H.K., et al. (2000) t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 27 (3), 285–294.
- [40] Jares, P., Colomer, D., and Campo, E. (2012) Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*. 122 (10), 3416–3423.
- [41] Kridel, R., Meissner, B., Rogic, S., Boyle, M., Telenius, A., Woolcock,

- B., et al. (2012) Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood*. 119 (9), 1963–1971.
- [42] Dal Col, J., Zancai, P., Terrin, L., Guidoboni, M., Ponzoni, M., Pavan, A., et al. (2008) Distinct functional significance of Akt and mTOR constitutive activation in mantle cell lymphoma. *Blood*. 111 (10), 5142–5151.
- [43] Baran-Marszak, F., Boukhiar, M., Harel, S., Laguillier, C., Roger, C., Gressin, R., et al. (2010) Constitutive and B-cell receptor-induced activation of STAT3 are important signaling pathways targeted by bortezomib in leukemic mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 95 (11), 1865–1872.
- [44] Rizzatti, E.G., Falcão, R.P., Panepucci, R.A., Proto-Siqueira, R., Anselmo-Lima, W.T., Okamoto, O.K., et al. (2005) Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFbeta signalling pathways. *British Journal of Haematology*. 130 (4), 516–526.
- [45] Gelebart, P., Anand, M., Armanious, H., Peters, A.C., Dien Bard, J., Amin, H.M., et al. (2008) Constitutive activation of the Wnt canonical pathway in mantle cell lymphoma. *Blood*. 112 (13), 5171–5179.
- [46] Pham, L.V., Tamayo, A.T., Yoshimura, L.C., Lo, P., and Ford, R.J. (2003) Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 171 (1), 88–95.
- [47] Argatoff, L.H., Connors, J.M., Klasa, R.J., Horsman, D.E., and Gascoyne, R.D. (1997) Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*. 89 (6), 2067–2078.
- [48] Bosch, F., López-Guillermo, A., Campo, E., Ribera, J.M., Conde, E., Piris, M.A., et al. (1998) Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer*. 82 (3), 567–575.
- [49] Ferrer, A., Bosch, F., Villamor, N., Rozman, M., Graus, F., Gutiérrez, G., et al. (2008) Central nervous system involvement in mantle cell lymphoma. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 19 (1), 135–141.
- [50] Hoster, E., Dreyling, M., Klapper, W., Gisselbrecht, C., van Hoof, A., Kluin-Nelemans, H.C., et al. (2008) A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood*. 111 (2), 558–565.
- [51] Katzenberger, T., Petzoldt, C., Höller, S., Mäder, U., Kalla, J., Adam, P., et al. (2006) The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Blood*. 107 (8), 3407.
- [52] Gerdes, J., Dallenbach, F., Lennert, K., Lemke, H., and Stein, H. (1984) Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematological Oncology*. 2 (4), 365–371.
- [53] Tiemann, M., Schrader, C., Klapper, W., Dreyling, M.H., Campo, E., Norton, A., et al. (2005) Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *British Journal of Haematology*. 131 (1), 29–38.

- [54] Vigouroux, S., Gaillard, F., Moreau, P., Harousseau, J.-L., and Milpied, N. (2005) High-dose therapy with autologous stem cell transplantation in first response in mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 90 (11), 1580–1582.
- [55] Martin, P., Chadburn, A., Christos, P., Furman, R., Ruan, J., Joyce, M.A., et al. (2008) Intensive treatment strategies may not provide superior outcomes in mantle cell lymphoma: overall survival exceeding 7 years with standard therapies. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 19 (7), 1327–1330.
- [56] Nodit, L., Bahler, D.W., Jacobs, S.A., Locker, J., and Swerdlow, S.H. (2003) Indolent mantle cell lymphoma with nodal involvement and mutated immunoglobulin heavy chain genes. *Human Pathology*. 34 (10), 1030–1034.
- [57] Orchard, J., Garand, R., Davis, Z., Babbage, G., Sahota, S., Matutes, E., et al. (2003) A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood*. 101 (12), 4975–4981.
- [58] Ladha, A., Zhao, J., Epner, E.M., and Pu, J.J. (2019) Mantle cell lymphoma and its management: where are we now? *Experimental Hematology & Oncology*. 8.
- [59] Skarbnik, A.P. and Goy, A.H. (2015) Mantle cell lymphoma: state of the art. *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O*. 13 (1), 44–55.
- [60] Lee, C. and Martin, P. (2020) Watch and Wait in Mantle Cell Lymphoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 34 (5), 837–847.
- [61] Lenz, G., Dreyling, M., Hoster, E., Wörmann, B., Dührsen, U., Metzner, B., et al. (2005) Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 23 (9), 1984–1992.
- [62] Dreger, P., Martin, S., Kuse, R., Sonnen, R., Glass, B., Kröger, N., et al. (2000) The impact of autologous stem cell transplantation on the prognosis of mantle cell lymphoma: a joint analysis of two prospective studies with 46 patients. *The Hematology Journal: The Official Journal of the European Haematology Association / EHA*. 1 (2), 87–94.
- [63] Khouri, I.F., Romaguera, J., Kantarjian, H., Palmer, J.L., Pugh, W.C., Korbling, M., et al. (1998) Hyper-CVAD and high-dose methotrexate/cytarabine followed by stem-cell transplantation: an active regimen for aggressive mantle-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 16 (12), 3803–3809.
- [64] Hermine, O., Hoster, E., Walewski, J., Ribrag, V., Brousse, N., Thieblemont, C., et al. (2012) Alternating Courses of 3x CHOP and 3x DHAP Plus Rituximab Followed by a High Dose ARA-C Containing Myeloablative Regimen and Autologous Stem Cell Transplantation (ASCT) Increases Overall Survival When Compared to 6 Courses of

- CHOP Plus Rituximab Followed by Myeloablative Radiochemotherapy and ASCT in Mantle Cell Lymphoma: Final Analysis of the MCL Younger Trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network (MCL net). *Blood*. 120 (21), 151–151.
- [65] Hermine, O., Hoster, E., Walewski, J., Bosly, A., Stilgenbauer, S., Thieblemont, C., et al. (2016) Addition of high-dose cytarabine to immunochemotherapy before autologous stem-cell transplantation in patients aged 65 years or younger with mantle cell lymphoma (MCL Younger): a randomised, open-label, phase 3 trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Lancet (London, England)*. 388 (10044), 565–575.
- [66] Le Gouill, S., Thieblemont, C., Oberic, L., Moreau, A., Bouabdallah, K., Dartigeas, C., et al. (2017) Rituximab after Autologous Stem-Cell Transplantation in Mantle-Cell Lymphoma. *The New England Journal of Medicine*. 377 (13), 1250–1260.
- [67] Rummel, M.J., Al-Batran, S.E., Kim, S.-Z., Welslau, M., Hecker, R., Kofahl-Krause, D., et al. (2005) Bendamustine plus rituximab is effective and has a favorable toxicity profile in the treatment of mantle cell and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 23 (15), 3383–3389.
- [68] Visco, C., Chiappella, A., Nassi, L., Patti, C., Ferrero, S., Barbero, D., et al. (2017) Rituximab, bendamustine, and low-dose cytarabine as induction therapy in elderly patients with mantle cell lymphoma: a multicentre, phase 2 trial from Fondazione Italiana Linfomi. *The Lancet. Haematology*. 4 (1), e15–e23.
- [69] Robak, T., Jin, J., Pylypenko, H., Verhoef, G., Siritanaratkul, N., Drach, J., et al. (2018) Frontline bortezomib, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (VR-CAP) versus rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) in transplantation-ineligible patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma: final overall survival results of a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet. Oncology*. 19 (11), 1449–1458.
- [70] Goy, A., Bernstein, S.H., Kahl, B.S., Djulbegovic, B., Robertson, M.J., de Vos, S., et al. (2009) Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 20 (3), 520–525.
- [71] Lamm, W., Kaufmann, H., Raderer, M., Hoffmann, M., Chott, A., Zielinski, C., et al. (2011) Bortezomib combined with rituximab and dexamethasone is an active regimen for patients with relapsed and chemotherapy-refractory mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 96 (7), 1008–1014.
- [72] Bartlett, J.B., Dredge, K., and Dalglish, A.G. (2004) The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nature Reviews. Cancer*. 4 (4), 314–322.
- [73] Wiernik, P.H., Lossos, I.S., Tuscano, J.M., Justice, G., Vose, J.M., Cole, C.E., et al. (2008) Lenalidomide monotherapy in relapsed or refractory

- aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 26 (30), 4952–4957.
- [74] Zaja, F., De Luca, S., Vitolo, U., Orsucci, L., Levis, A., Salvi, F., et al. (2012) Salvage treatment with lenalidomide and dexamethasone in relapsed/refractory mantle cell lymphoma: clinical results and effects on microenvironment and neo-angiogenic biomarkers. *Haematologica*. 97 (3), 416–422.
- [75] Wang, M., Fayad, L., Wagner-Bartak, N., Zhang, L., Hagemester, F., Neelapu, S.S., et al. (2012) Lenalidomide in combination with rituximab for patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: a phase 1/2 clinical trial. *The Lancet. Oncology*. 13 (7), 716–723.
- [76] Honigberg, L.A., Smith, A.M., Sirisawad, M., Verner, E., Lounsbury, D., Chang, B., et al. (2010) The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107 (29), 13075–13080.
- [77] Wang, M.L., Rule, S., Martin, P., Goy, A., Auer, R., Kahl, B.S., et al. (2013) Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *The New England Journal of Medicine*. 369 (6), 507–516.
- [78] Rudelius, M., Pittaluga, S., Nishizuka, S., Pham, T.H.-T., Fend, F., Jaffe, E.S., et al. (2006) Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood*. 108 (5), 1668–1676.
- [79] Hidalgo, M. and Rowinsky, E.K. (2000) The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene*. 19 (56), 6680–6686.
- [80] Witzig, T.E., Geyer, S.M., Ghobrial, I., Inwards, D.J., Fonseca, R., Kurtin, P., et al. (2005) Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 23 (23), 5347–5356.
- [81] Ansell, S.M., Inwards, D.J., Rowland, K.M., Flynn, P.J., Morton, R.F., Moore, D.F., et al. (2008) Low-Dose, Single-Agent Temsirolimus for Relapsed Mantle Cell Lymphoma. *Cancer*. 113 (3), 508–514.
- [82] Tessoulin, B., Ceballos, P., Chevallier, P., Blaise, D., Tournilhac, O., Gauthier, J., et al. (2016) Allogeneic stem cell transplantation for patients with mantle cell lymphoma who failed autologous stem cell transplantation: a national survey of the SFGM-TC. *Bone Marrow Transplantation*. 51 (9), 1184–1190.
- [83] Kochenderfer, J.N., Somerville, R.P.T., Lu, T., Shi, V., Bot, A., Rossi, J., et al. (2017) Lymphoma Remissions Caused by Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells Are Associated With High Serum Interleukin-15 Levels. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 35 (16), 1803–1813.
- [84] Chen, W., Du, X., Luo, C., Zhang, Q., and Wang, M. (2016) Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells Improve Responses to Chemotherapy-Refractory Mantle Cell Lymphoma: A Case Report.

- Blood*. 128 (22), 5393–5393.
- [85] Wang, M., Munoz, J., Goy, A., Locke, F.L., Jacobson, C.A., Hill, B.T., et al. (2020) KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *The New England Journal of Medicine*. 382 (14), 1331–1342.
- [86] Dreyling M et al, Mantelzell-Lymphom. *Onkopedia*. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mantelzell-lymphom/@@guideline/html/index.html> abgerufen am 10.08.2021 um 22:05 Uhr
- [87] Cuypers, H.T., Selten, G., Quint, W., Zijlstra, M., Maandag, E.R., Boelens, W., et al. (1984) Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell*. 37 (1), 141–150.
- [88] Saris, C.J., Domen, J., and Berns, A. (1991) The pim-1 oncogene encodes two related protein-serine/threonine kinases by alternative initiation at AUG and CUG. *The EMBO Journal*. 10 (3), 655–664.
- [89] Xie, Y., Xu, K., Dai, B., Guo, Z., Jiang, T., Chen, H., et al. (2006) The 44 kDa Pim-1 kinase directly interacts with tyrosine kinase Etk/BMX and protects human prostate cancer cells from apoptosis induced by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*. 25 (1), 70–78.
- [90] Nawijn, M.C., Alendar, A., and Berns, A. (2011) For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis. *Nature Reviews. Cancer*. 11 (1), 23–34.
- [91] Saurabh, K., Scherzer, M.T., Shah, P.P., Mims, A.S., Lockwood, W.W., Kraft, A.S., et al. (2014) The PIM family of oncoproteins: Small kinases with huge implications in myeloid leukemogenesis and as therapeutic targets. *Oncotarget*. 5 (18), 8503–8514.
- [92] Reeves, R., Spies, G.A., Kiefer, M., Barr, P.J., and Power, M. (1990) Primary structure of the putative human oncogene, pim-1. *Gene*. 90 (2), 303–307.
- [93] Bullock, A.N., Debreczeni, J., Amos, A.L., Knapp, S., and Turk, B.E. (2005) Structure and substrate specificity of the Pim-1 kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 280 (50), 41675–41682.
- [94] Mikkers, H., Nawijn, M., Allen, J., Brouwers, C., Verhoeven, E., Jonkers, J., et al. (2004) Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors. *Molecular and Cellular Biology*. 24 (13), 6104–6115.
- [95] Allen, J.D. and Berns, A. (1996) Complementation tagging of cooperating oncogenes in knockout mice. *Seminars in Cancer Biology*. 7 (5), 299–306.
- [96] Qian, K.C., Wang, L., Hickey, E.R., Studts, J., Barringer, K., Peng, C., et al. (2005) Structural basis of constitutive activity and a unique nucleotide binding mode of human Pim-1 kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 280 (7), 6130–6137.
- [97] Zhu, N., Ramirez, L.M., Lee, R.L., Magnuson, N.S., Bishop, G.A., and Gold, M.R. (2002) CD40 signaling in B cells regulates the expression of the Pim-1 kinase via the NF-kappa B pathway. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 168 (2), 744–754.
- [98] Matikainen, S., Sareneva, T., Ronni, T., Lehtonen, A., Koskinen, P.J.,

- and Julkunen, I. (1999) Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells. *Blood*. 93 (6), 1980–1991.
- [99] Yip-Schneider, M.T., Horie, M., and Broxmeyer, H.E. (1995) Transcriptional induction of pim-1 protein kinase gene expression by interferon gamma and posttranscriptional effects on costimulation with steel factor. *Blood*. 85 (12), 3494–3502.
- [100] Nieborowska-Skorska, M., Hoser, G., Kossev, P., Wasik, M.A., and Skorski, T. (2002) Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Blood*. 99 (12), 4531–4539.
- [101] Kim, K.-T., Baird, K., Ahn, J.-Y., Meltzer, P., Lilly, M., Levis, M., et al. (2005) Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood*. 105 (4), 1759–1767.
- [102] Chen, J., Kobayashi, M., Darmanin, S., Qiao, Y., Gully, C., Zhao, R., et al. (2009) Hypoxia-Mediated Up-Regulation of Pim-1 Contributes to Solid Tumor Formation. *The American Journal of Pathology*. 175 (1), 400–411.
- [103] Chen, J., Kobayashi, M., Darmanin, S., Qiao, Y., Gully, C., Zhao, R., et al. (2009) Pim-1 plays a pivotal role in hypoxia-induced chemoresistance. *Oncogene*. 28 (28), 2581–2592.
- [104] Zhao, Y., Hamza, M.S., Leong, H.S., Lim, C.-B., Pan, Y.-F., Cheung, E., et al. (2008) Kruppel-like factor 5 modulates p53-independent apoptosis through Pim1 survival kinase in cancer cells. *Oncogene*. 27 (1), 1–8.
- [105] Wozniak, M.B., Villuendas, R., Bischoff, J.R., Aparicio, C.B., Martínez Leal, J.F., de La Cueva, P., et al. (2010) Vorinostat interferes with the signaling transduction pathway of T-cell receptor and synergizes with phosphoinositide-3 kinase inhibitors in cutaneous T-cell lymphoma. *Haematologica*. 95 (4), 613–621.
- [106] Zemskova, M., Sahakian, E., Bashkirova, S., and Lilly, M. (2008) The PIM1 Kinase Is a Critical Component of a Survival Pathway Activated by Docetaxel and Promotes Survival of Docetaxel-treated Prostate Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 283 (30), 20635–20644.
- [107] Hoover, D.S., Wingett, D.G., Zhang, J., Reeves, R., and Magnuson, N.S. (1997) Pim-1 protein expression is regulated by its 5'-untranslated region and translation initiation factor eIF-4E. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*. 8 (12), 1371–1380.
- [108] Losman, J.A., Chen, X.P., Vuong, B.Q., Fay, S., and Rothman, P.B. (2003) Protein phosphatase 2A regulates the stability of Pim protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (7), 4800–4805.
- [109] Shay, K.P., Wang, Z., Xing, P.-X., McKenzie, I.F.C., and Magnuson, N.S. (2005) Pim-1 kinase stability is regulated by heat shock proteins and the ubiquitin-proteasome pathway. *Molecular Cancer Research: MCR*. 3 (3), 170–181.
- [110] Amson, R., Sigaux, F., Przedborski, S., Flandrin, G., Givol, D., and Telerman, A. (1989) The human protooncogene product p33pim is expressed during fetal hematopoiesis and in diverse leukemias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86 (22), 8857–8861.



- [111] Allen, J.D., Verhoeven, E., Domen, J., van der Valk, M., and Berns, A. (1997) Pim-2 transgene induces lymphoid tumors, exhibiting potent synergy with c-myc. *Oncogene*. 15 (10), 1133–1141.
- [112] Feldman, J.D., Vician, L., Crispino, M., Tocco, G., Marcheselli, V.L., Bazan, N.G., et al. (1998) KID-1, a protein kinase induced by depolarization in brain. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (26), 16535–16543.
- [113] Amaravadi, R. and Thompson, C.B. (2005) The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *The Journal of Clinical Investigation*. 115 (10), 2618–2624.
- [114] Morishita, D., Katayama, R., Sekimizu, K., Tsuruo, T., and Fujita, N. (2008) Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer Research*. 68 (13), 5076–5085.
- [115] Slingerland, J. and Pagano, M. (2000) Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 183 (1), 10–17.
- [116] Wang, Z., Bhattacharya, N., Mixter, P.F., Wei, W., Sedivy, J., and Magnuson, N.S. (2002) Phosphorylation of the cell cycle inhibitor p21Cip1/WAF1 by Pim-1 kinase. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1593 (1), 45–55.
- [117] Xia, W., Chen, J.-S., Zhou, X., Sun, P.-R., Lee, D.-F., Liao, Y., et al. (2004) Phosphorylation/cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 is associated with HER2/neu overexpression and provides a novel combination predictor for poor prognosis in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 10 (11), 3815–3824.
- [118] Mochizuki, T., Kitanaka, C., Noguchi, K., Muramatsu, T., Asai, A., and Kuchino, Y. (1999) Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (26), 18659–18666.
- [119] Bhattacharya, N., Wang, Z., Davitt, C., McKenzie, I.F.C., Xing, P.-X., and Magnuson, N.S. (2002) Pim-1 associates with protein complexes necessary for mitosis. *Chromosoma*. 111 (2), 80–95.
- [120] Yan, B., Zemskova, M., Holder, S., Chin, V., Kraft, A., Koskinen, P.J., et al. (2003) The PIM-2 kinase phosphorylates BAD on serine 112 and reverses BAD-induced cell death. *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (46), 45358–45367.
- [121] Li, Y.-Y., Popivanova, B.K., Nagai, Y., Ishikura, H., Fujii, C., and Mukaida, N. (2006) Pim-3, a proto-oncogene with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human pancreatic cancer and phosphorylates bad to block bad-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer Research*. 66 (13), 6741–6747.
- [122] Gu, J.J., Wang, Z., Reeves, R., and Magnuson, N.S. (2009) PIM1 phosphorylates and negatively regulates ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene*. 28 (48), 4261–4271.
- [123] Zhang, F., Beharry, Z.M., Harris, T.E., Lilly, M.B., Smith, C.D., Mahajan, S., et al. (2009) PIM1 protein kinase regulates PRAS40 phosphorylation

- and mTOR activity in FDCP1 cells. *Cancer Biology & Therapy*. 8 (9), 846–853.
- [124] Fox, C.J., Hammerman, P.S., Cinalli, R.M., Master, S.R., Chodosh, L.A., and Thompson, C.B. (2003) The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. *Genes & Development*. 17 (15), 1841–1854.
- [125] Zippo, A., De Robertis, A., Serafini, R., and Oliviero, S. (2007) PIM1-dependent phosphorylation of histone H3 at serine 10 is required for MYC-dependent transcriptional activation and oncogenic transformation. *Nature Cell Biology*. 9 (8), 932–944.
- [126] Rainio, E.-M., Sandholm, J., and Koskinen, P.J. (2002) Cutting edge: Transcriptional activity of NFATc1 is enhanced by the Pim-1 kinase. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 168 (4), 1524–1527.
- [127] Hay, N. and Sonenberg, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development*. 18 (16), 1926–1945.
- [128] Mondello, P., Cuzzocrea, S., and Mian, M. (2014) Pim kinases in hematological malignancies: where are we now and where are we going? *Journal of Hematology & Oncology*. 7.
- [129] Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., et al. (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*. 387 (6636), 921–924.
- [130] Starr, R., Willson, T.A., Viney, E.M., Murray, L.J., Rayner, J.R., Jenkins, B.J., et al. (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*. 387 (6636), 917–921.
- [131] Chen, X.P., Losman, J.A., Cowan, S., Donahue, E., Fay, S., Vuong, B.Q., et al. (2002) Pim serine/threonine kinases regulate the stability of Socs-1 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (4), 2175–2180.
- [132] Peltola, K.J., Paukku, K., Aho, T.L.T., Ruuska, M., Silvennoinen, O., and Koskinen, P.J. (2004) Pim-1 kinase inhibits STAT5-dependent transcription via its interactions with SOCS1 and SOCS3. *Blood*. 103 (10), 3744–3750.
- [133] Hogan, C., Hutchison, C., Marcar, L., Milne, D., Saville, M., Goodlad, J., et al. (2008) Elevated Levels of Oncogenic Protein Kinase Pim-1 Induce the p53 Pathway in Cultured Cells and Correlate with Increased Mdm2 in Mantle Cell Lymphoma. *The Journal of Biological Chemistry*. 283 (26), 18012–18023.
- [134] Selten, G., Cuypers, H.T., and Berns, A. (1985) Proviral activation of the putative oncogene Pim-1 in MuLV induced T-cell lymphomas. *The EMBO Journal*. 4 (7), 1793–1798.
- [135] Hsi, E.D., Jung, S.-H., Lai, R., Johnson, J.L., Cook, J.R., Jones, D., et al. (2008) Ki67 and PIM1 expression predict outcome in mantle cell lymphoma treated with high dose therapy, stem cell transplantation and rituximab: a Cancer and Leukemia Group B 59909 correlative science study. *Leukemia & Lymphoma*. 49 (11), 2081–2090.
- [136] Buchholz, M., Braun, M., Heidenblut, A., Kestler, H.A., Klöppel, G., Schmiegel, W., et al. (2005) Transcriptome analysis of microdissected pancreatic intraepithelial neoplastic lesions. *Oncogene*. 24 (44), 6626–6636.

- [137] Sepulveda, A.R., Tao, H., Carloni, E., Sepulveda, J., Graham, D.Y., and Peterson, L.E. (2002) Screening of gene expression profiles in gastric epithelial cells induced by *Helicobacter pylori* using microarray analysis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 16 Suppl 2 145–157.
- [138] Guo, S., Mao, X., Chen, J., Huang, B., Jin, C., Xu, Z., et al. (2010) Overexpression of Pim-1 in bladder cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*. 29 161.
- [139] Nga, M.E., Swe, N.N.M., Chen, K.T., Shen, L., Lilly, M.B., Chan, S.P., et al. (2010) PIM-1 kinase expression in adipocytic neoplasms: diagnostic and biological implications. *International Journal of Experimental Pathology*. 91 (1), 34–43.
- [140] Valdman, A., Fang, X., Pang, S.-T., Ekman, P., and Egevad, L. (2004) Pim-1 expression in prostatic intraepithelial neoplasia and human prostate cancer. *The Prostate*. 60 (4), 367–371.
- [141] Wang, J., Kim, J., Roh, M., Franco, O.E., Hayward, S.W., Wills, M.L., et al. (2010) Pim1 kinase synergizes with c-MYC to induce advanced prostate carcinoma. *Oncogene*. 29 (17), 2477–2487.
- [142] Cohen, A.M., Grinblat, B., Bessler, H., Kristt, D., Kremer, A., Schwartz, A., et al. (2004) Increased expression of the hPim-2 gene in human chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*. 45 (5), 951–955.
- [143] Tamburini, J., Green, A.S., Bardet, V., Chapuis, N., Park, S., Willems, L., et al. (2009) Protein synthesis is resistant to rapamycin and constitutes a promising therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood*. 114 (8), 1618–1627.
- [144] Dai, H., Li, R., Wheeler, T., Diaz de Vivar, A., Frolov, A., Tahir, S., et al. (2005) Pim-2 upregulation: biological implications associated with disease progression and perineural invasion in prostate cancer. *The Prostate*. 65 (3), 276–286.
- [145] Fujii, C., Nakamoto, Y., Lu, P., Tsuneyama, K., Popivanova, B.K., Kaneko, S., et al. (2005) Aberrant expression of serine/threonine kinase Pim-3 in hepatocellular carcinoma development and its role in the proliferation of human hepatoma cell lines. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*. 114 (2), 209–218.
- [146] Popivanova, B.K., Li, Y.-Y., Zheng, H., Omura, K., Fujii, C., Tsuneyama, K., et al. (2007) Proto-oncogene, Pim-3 with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human colon cancer cells and can prevent Bad-mediated apoptosis. *Cancer Science*. 98 (3), 321–328.
- [147] Zheng, H.-C., Tsuneyama, K., Takahashi, H., Miwa, S., Sugiyama, T., Popivanova, B.K., et al. (2008) Aberrant Pim-3 expression is involved in gastric adenoma-adenocarcinoma sequence and cancer progression. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 134 (4), 481–488.
- [148] Liang, H., Hittelman, W., and Nagarajan, L. (1996) Ubiquitous expression and cell cycle regulation of the protein kinase PIM-1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 330 (2), 259–265.
- [149] van Lohuizen, M., Verbeek, S., Krimpenfort, P., Domen, J., Saris, C., Radaszkiewicz, T., et al. (1989) Predisposition to lymphomagenesis in pim-1 transgenic mice: cooperation with c-myc and N-myc in murine leukemia virus-induced tumors. *Cell*. 56 (4), 673–682.

- [150] Verbeek, S., van Lohuizen, M., van der Valk, M., Domen, J., Kraal, G., and Berns, A. (1991) Mice bearing the E mu-myc and E mu-pim-1 transgenes develop pre-B-cell leukemia prenatally. *Molecular and Cellular Biology*. 11 (2), 1176–1179.
- [151] Kim, J., Roh, M., and Abdulkadir, S.A. (2010) Pim1 promotes human prostate cancer cell tumorigenicity and c-MYC transcriptional activity. *BMC Cancer*. 10 248.
- [152] Narlik-Grassow, M., Blanco-Aparicio, C., and Carnero, A. (2014) The PIM family of serine/threonine kinases in cancer. *Medicinal Research Reviews*. 34 (1), 136–159.
- [153] Roh, M., Gary, B., Song, C., Said-Al-Naief, N., Tousson, A., Kraft, A., et al. (2003) Overexpression of the oncogenic kinase Pim-1 leads to genomic instability. *Cancer Research*. 63 (23), 8079–8084.
- [154] Blanco-Aparicio, C. and Carnero, A. (2013) Pim kinases in cancer: diagnostic, prognostic and treatment opportunities. *Biochemical Pharmacology*. 85 (5), 629–643.
- [155] Blanco-Aparicio, C., Collazo, A.M.G., Oyarzabal, J., Leal, J.F., Albarán, M.I., Lima, F.R., et al. (2011) Pim 1 kinase inhibitor ETP-45299 suppresses cellular proliferation and synergizes with PI3K inhibition. *Cancer Letters*. 300 (2), 145–153.
- [156] Pogacic, V., Bullock, A.N., Fedorov, O., Filippakopoulos, P., Gasser, C., Biondi, A., et al. (2007) Structural analysis identifies imidazo[1,2-b]pyridazines as PIM kinase inhibitors with in vitro antileukemic activity. *Cancer Research*. 67 (14), 6916–6924.
- [157] Santio, N.M., Vahakoski, R.L., Rainio, E.-M., Sandholm, J.A., Virtanen, S.S., Prudhomme, M., et al. (2010) Pim-selective inhibitor DHPCC-9 reveals Pim kinases as potent stimulators of cancer cell migration and invasion. *Molecular Cancer*. 9 279.
- [158] Zhang, P., Wang, H., Min, X., Wang, Y., Tang, J., Cheng, J., et al. (2009) Pim-3 is expressed in endothelial cells and promotes vascular tube formation. *Journal of Cellular Physiology*. 220 (1), 82–90.
- [159] Chen, L.S., Redkar, S., Bearss, D., Wierda, W.G., and Gandhi, V. (2009) Pim kinase inhibitor, SGI-1776, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 114 (19), 4150–4157.
- [160] Chen, L.S., Redkar, S., Taverna, P., Cortes, J.E., and Gandhi, V. (2011) Mechanisms of cytotoxicity to Pim kinase inhibitor, SGI-1776, in acute myeloid leukemia. *Blood*. 118 (3), 693–702.
- [161] Yang, Q., Chen, L.S., Neelapu, S.S., Miranda, R.N., Medeiros, L.J., and Gandhi, V. (2012) Transcription and translation are primary targets of Pim kinase inhibitor SGI-1776 in mantle cell lymphoma. *Blood*. 120 (17), 3491–3500.
- [162] Batra, V., Maris, J.M., Kang, M.H., Reynolds, C.P., Houghton, P.J., Alexander, D., et al. (2012) Initial testing (stage 1) of SGI-1776, a PIM1 kinase inhibitor, by the pediatric preclinical testing program. *Pediatric Blood & Cancer*. 59 (4), 749–752.
- [163] Muraski, J.A., Rota, M., Misao, Y., Fransioli, J., Cottage, C., Gude, N., et al. (2007) Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt. *Nature Medicine*. 13 (12), 1467–1475.
- [164] Lin, Y.-W., Beharry, Z.M., Hill, E.G., Song, J.H., Wang, W., Xia, Z., et al.

- (2010) A small molecule inhibitor of Pim protein kinases blocks the growth of precursor T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Blood*. 115 (4), 824–833.
- [165] Garcia, P.D., Langowski, J.L., Wang, Y., Chen, M., Castillo, J., Fanton, C., et al. (2014) Pan-PIM kinase inhibition provides a novel therapy for treating hematologic cancers. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 20 (7), 1834–1845.
- [166] Keeton, E.K., McEachern, K., Dillman, K.S., Palakurthi, S., Cao, Y., Grondine, M.R., et al. (2014) AZD1208, a potent and selective pan-Pim kinase inhibitor, demonstrates efficacy in preclinical models of acute myeloid leukemia. *Blood*. 123 (6), 905–913.
- [167] Pópulo, H., Lopes, J.M., and Soares, P. (2012) The mTOR signalling pathway in human cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 13 (2), 1886–1918.
- [168] Fruman, D.A. (2004) Towards an understanding of isoform specificity in phosphoinositide 3-kinase signalling in lymphocytes. *Biochemical Society Transactions*. 32 (Pt 2), 315–319.
- [169] Chantry, D., Vojtek, A., Kashishian, A., Holtzman, D.A., Wood, C., Gray, P.W., et al. (1997) p110delta, a novel phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit that associates with p85 and is expressed predominantly in leukocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (31), 19236–19241.
- [170] Srinivasan, L., Sasaki, Y., Calado, D.P., Zhang, B., Paik, J.H., DePinho, R.A., et al. (2009) PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell*. 139 (3), 573–586.
- [171] Herman, S.E.M. and Johnson, A.J. (2012) Molecular pathways: targeting phosphoinositide 3-kinase p110-delta in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 18 (15), 4013–4018.
- [172] Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Painter, G.F., et al. (1997) Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science (New York, N.Y.)*. 277 (5325), 567–570.
- [173] Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., et al. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal*. 15 (23), 6541–6551.
- [174] Vivanco, I. and Sawyers, C.L. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews. Cancer*. 2 (7), 489–501.
- [175] Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., et al. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 91 (2), 231–241.
- [176] Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., et al. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*. 282 (5392), 1318–1321.
- [177] Mayo, L.D. and Donner, D.B. (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*. 98 (20), 11598–11603.
- [178] Romashkova, J.A. and Makarov, S.S. (1999) NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*. 401 (6748), 86–90.
- [179] Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & Development*. 12 (22), 3499–3511.
- [180] Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 378 (6559), 785–789.
- [181] Graff, J.R., Konicek, B.W., McNulty, A.M., Wang, Z., Houck, K., Allen, S., et al. (2000) Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (32), 24500–24505.
- [182] Lawlor, M.A. and Rotwein, P. (2000) Insulin-like growth factor-mediated muscle cell survival: central roles for Akt and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Molecular and Cellular Biology*. 20 (23), 8983–8995.
- [183] Zhou, H. and Huang, S. (2010) The complexes of mammalian target of rapamycin. *Current Protein & Peptide Science*. 11 (6), 409–424.
- [184] Navé, B.T., Ouwens, M., Withers, D.J., Alessi, D.R., and Shepherd, P.R. (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *The Biochemical Journal*. 344 Pt 2 427–431.
- [185] Kim, D.-H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., et al. (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 110 (2), 163–175.
- [186] Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.-H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., et al. (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current Biology: CB*. 14 (14), 1296–1302.
- [187] Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., et al. (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell*. 10 (3), 457–468.
- [188] Moore, S.F., Hunter, R.W., and Hers, I. (2011) mTORC2 protein complex-mediated Akt (Protein Kinase B) Serine 473 Phosphorylation is not required for Akt1 activity in human platelets [corrected]. *The Journal of Biological Chemistry*. 286 (28), 24553–24560.
- [189] Burnett, P.E., Barrow, R.K., Cohen, N.A., Snyder, S.H., and Sabatini, D.M. (1998) RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95 (4), 1432–1437.
- [190] Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 124 (3), 471–484.
- [191] Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., et al. (2007) PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the

- mTORC1 protein kinase. *Molecular Cell*. 25 (6), 903–915.
- [192] Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.-L. (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*. 4 (9), 648–657.
- [193] Ali, I.U., Schriml, L.M., and Dean, M. (1999) Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *Journal of the National Cancer Institute*. 91 (22), 1922–1932.
- [194] Nakahara, Y., Nagai, H., Kinoshita, T., Uchida, T., Hatano, S., Murate, T., et al. (1998) Mutational analysis of the PTEN/MMAC1 gene in non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. 12 (8), 1277–1280.
- [195] Psyrris, A., Papageorgiou, S., Liakata, E., Scorilas, A., Rontogianni, D., Kontos, C.K., et al. (2009) Phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha gene amplification contributes to the pathogenesis of mantle cell lymphoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 15 (18), 5724–5732.
- [196] Suzuki, A., Kaisho, T., Ohishi, M., Tsukio-Yamaguchi, M., Tsubata, T., Koni, P.A., et al. (2003) Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination. *The Journal of Experimental Medicine*. 197 (5), 657–667.
- [197] Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (1998) Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nature Genetics*. 19 (4), 348–355.
- [198] Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Stambolic, V., Elia, A.J., Sasaki, T., del Barco Barrantes, I., et al. (1998) High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Current Biology: CB*. 8 (21), 1169–1178.
- [199] Peponi, E., Drakos, E., Reyes, G., Leventaki, V., Rassidakis, G.Z., and Medeiros, L.J. (2006) Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma. *The American Journal of Pathology*. 169 (6), 2171–2180.
- [200] Arcaro, A. and Wymann, M.P. (1993) Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *The Biochemical Journal*. 296 ( Pt 2) 297–301.
- [201] Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., and Brown, R.F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of Biological Chemistry*. 269 (7), 5241–5248.
- [202] Crabbe, T., Welham, M.J., and Ward, S.G. (2007) The PI3K inhibitor arsenal: choose your weapon! *Trends in Biochemical Sciences*. 32 (10), 450–456.
- [203] Lannutti, B.J., Meadows, S.A., Herman, S.E.M., Kashishian, A., Steiner, B., Johnson, A.J., et al. (2011) CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood*. 117 (2), 591–594.
- [204] Brown, J.R., Byrd, J.C., Coutre, S.E., Benson, D.M., Flinn, I.W., Wagner-Johnston, N.D., et al. (2014) Idelalisib, an inhibitor of

- phosphatidylinositol 3-kinase p110 $\delta$ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 123 (22), 3390–3397.
- [205] Busaidy, N.L., Farooki, A., Dowlati, A., Perentesis, J.P., Dancey, J.E., Doyle, L.A., et al. (2012) Management of metabolic effects associated with anticancer agents targeting the PI3K-Akt-mTOR pathway. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 30 (23), 2919–2928.
- [206] Furman, R.R., Sharman, J.P., Coutre, S.E., Cheson, B.D., Pagel, J.M., Hillmen, P., et al. (2014) Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 370 (11), 997–1007.
- [207] Gopal, A.K., Kahl, B.S., de Vos, S., Wagner-Johnston, N.D., Schuster, S.J., Jurczak, W.J., et al. (2014) PI3K $\delta$  inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *The New England Journal of Medicine*. 370 (11), 1008–1018.
- [208] Yang, Q., Modi, P., Newcomb, T., Quéva, C., and Gandhi, V. (2015) Idelalisib: First-in-Class PI3K Delta Inhibitor for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia, Small Lymphocytic Leukemia, and Follicular Lymphoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 21 (7), 1537–1542.
- [209] Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S.H. (1994) RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*. 78 (1), 35–43.
- [210] Saunders, R.N., Metcalfe, M.S., and Nicholson, M.L. (2001) Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney International*. 59 (1), 3–16.
- [211] Grewe, M., Gansauge, F., Schmid, R.M., Adler, G., and Seufferlein, T. (1999) Regulation of cell growth and cyclin D1 expression by the constitutively active FRAP-p70s6K pathway in human pancreatic cancer cells. *Cancer Research*. 59 (15), 3581–3587.
- [212] Muthukkumar, S., Ramesh, T.M., and Bondada, S. (1995) Rapamycin, a potent immunosuppressive drug, causes programmed cell death in B lymphoma cells. *Transplantation*. 60 (3), 264–270.
- [213] Caballero, D., Campo, E., López-Guillermo, A., Martín, A., Arranz-Sáez, R., Giné, E., et al. (2013) Clinical practice guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up of patients with mantle cell lymphoma. Recommendations from the GEL/TAMO Spanish Cooperative Group. *Annals of Hematology*. 92 (9), 1151–1179.
- [214] Shariat, S.F., Karam, J.A., and Karakiewicz, P.I. (2009) Words of wisdom. Re: Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O’Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ; Global ARCC Trial. *N Engl J Med* 2007;356:2271-81. *European Urology*. 55 (1), 250–252.
- [215] Feldman, M.E., Apsel, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z.A., Ruggero, D., et al. (2009) Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biology*. 7 (2), e38.



- [216] Mohlin, S., Hansson, K., Radke, K., Martinez, S., Blanco-Apiricio, C., Garcia-Ruiz, C., et al. (2019) Anti-tumor effects of PIM/PI3K/mTOR triple kinase inhibitor IBL-302 in neuroblastoma. *EMBO Molecular Medicine*. 11 (8), e10058.
- [217] Patnaik, A., Appleman, L.J., Tolcher, A.W., Papadopoulos, K.P., Beeram, M., Rasco, D.W., et al. (2016) First-in-human phase I study of copanlisib (BAY 80-6946), an intravenous pan-class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors and non-Hodgkin's lymphomas. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. 27 (10), 1928–1940.
- [218] Faivre, S., Kroemer, G., and Raymond, E. (2006) Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 5 (8), 671–688.
- [219] Debatin, K.M. and Krammer, P.H. (1995) Resistance to APO-1 (CD95) induced apoptosis in T-ALL is determined by a BCL-2 independent anti-apoptotic program. *Leukemia*. 9 (5), 815–820.
- [220] Webb JL. et al (1963) Effect of more than one inhibitor. Enzyme and metabolic inhibitors. 1. *New York: Academic Press*. 66-79 (488-512).
- [221] Qin, X., Jiang, B., and Zhang, Y. (2016) 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle*. 15 (6), 781–786.
- [222] Minich, W.B., Balasta, M.L., Goss, D.J., and Rhoads, R.E. (1994) Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91 (16), 7668–7672.
- [223] Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E.S. (1994) CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 269 (49), 30761–30764.
- [224] Duan, H., Orth, K., Chinnaiyan, A.M., Poirier, G.G., Froelich, C.J., He, W.W., et al. (1996) ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *The Journal of Biological Chemistry*. 271 (28), 16720–16724.
- [225] Satoh, M.S. and Lindahl, T. (1992) Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature*. 356 (6367), 356–358.
- [226] Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., et al. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 376 (6535), 37–43.
- [227] Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E., and Poirier, G.G. (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Research*. 53 (17), 3976–3985.
- [228] Murphy, K.M., Ranganathan, V., Farnsworth, M.L., Kavallaris, M., and Lock, R.B. (2000) Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death and Differentiation*. 7 (1), 102–111.

- [229] Cameron, D., Piccart-Gebhart, M.J., Gelber, R.D., Procter, M., Goldhirsch, A., de Azambuja, E., et al. (2017) 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *Lancet (London, England)*. 389 (10075), 1195–1205.
- [230] Beharry, Z., Zemskova, M., Mahajan, S., Zhang, F., Ma, J., Xia, Z., et al. (2009) Novel benzylidene-thiazolidine-2,4-diones inhibit Pim protein kinase activity and induce cell cycle arrest in leukemia and prostate cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 8 (6), 1473–1483.
- [231] Liu, Z., Liu, H., Yuan, X., Wang, Y., Li, L., Wang, G., et al. (2018) Downregulation of Pim-2 induces cell cycle arrest in the G0/G1 phase via the p53-non-dependent p21 signaling pathway. *Oncology Letters*. 15 (4), 4079–4086.
- [232] Peponi, E., Drakos, E., Reyes, G., Leventaki, V., Rassidakis, G.Z., and Medeiros, L.J. (2006) Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma. *The American Journal of Pathology*. 169 (6), 2171–2180.
- [233] Blunt, M.D., Carter, M.J., Larrayoz, M., Smith, L.D., Aguilar-Hernandez, M., Cox, K.L., et al. (2015) The PI3K/mTOR inhibitor PF-04691502 induces apoptosis and inhibits microenvironmental signaling in CLL and the E $\mu$ -TCL1 mouse model. *Blood*. 125 (26), 4032–4041.
- [234] Chen, D., Mao, C., Zhou, Y., Su, Y., Liu, S., and Qi, W.-Q. (2016) PF-04691502, a dual PI3K/mTOR inhibitor has potent pre-clinical activity by inducing apoptosis and G1 cell cycle arrest in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas. *International Journal of Oncology*. 48 (1), 253–260.
- [235] Zang, C., Eucker, J., Liu, H., Müller, A., Possinger, K., and Scholz, C.W. (2013) Concurrent inhibition of PI3-kinase and mTOR induces cell death in diffuse large B cell lymphomas, a mechanism involving down regulation of Mcl-1. *Cancer Letters*. 339 (2), 288–297.
- [236] Müller, A., Zang, C., Chumduri, C., Dörken, B., Daniel, P.T., and Scholz, C.W. (2013) Concurrent inhibition of PI3K and mTORC1/mTORC2 overcomes resistance to rapamycin induced apoptosis by down-regulation of Mcl-1 in mantle cell lymphoma. *International Journal of Cancer*. 133 (8), 1813–1824.
- [237] Harada, M., Benito, J., Yamamoto, S., Kaur, S., Arslan, D., Ramirez, S., et al. (2015) The novel combination of dual mTOR inhibitor AZD2014 and pan-PIM inhibitor AZD1208 inhibits growth in acute myeloid leukemia via HSF pathway suppression. *Oncotarget*. 6 (35), 37930–37947.
- [238] Meja, K., Stengel, C., Sellar, R., Huszar, D., Davies, B.R., Gale, R.E., et al. (2014) PIM and AKT kinase inhibitors show synergistic cytotoxicity in acute myeloid leukaemia that is associated with convergence on mTOR and MCL1 pathways. *British Journal of Haematology*. 167 (1), 69–79.
- [239] Cortes, J., Tamura, K., DeAngelo, D.J., Bono, J. de, Lorente, D., Minden, M., et al. (2018) Phase I studies of AZD1208, a proviral integration Moloney virus kinase inhibitor in solid and haematological cancers. *British Journal of Cancer*. 118 (11), 1425.
- [240] Koblisch, H., Li, Y., Shin, N., Hall, L., Wang, Q., Wang, K., et al. (2018)

- Preclinical characterization of INCB053914, a novel pan-PIM kinase inhibitor, alone and in combination with anticancer agents, in models of hematologic malignancies. *PLoS ONE*. 13 (6),.
- [241] Mazzacurati, L., Collins, R.J., Pandey, G., Lambert-Showers, Q.T., Amin, N.E., Zhang, L., et al. (2019) The pan-PIM inhibitor INCB053914 displays potent synergy in combination with ruxolitinib in models of MPN. *Blood Advances*. 3 (22), 3503–3514.
- [242] Paíno, T., Garcia-Gomez, A., González-Méndez, L., San-Segundo, L., Hernández-García, S., López-Iglesias, A.-A., et al. (2017) The Novel Pan-PIM Kinase Inhibitor, PIM447, Displays Dual Antimyeloma and Bone-Protective Effects, and Potently Synergizes with Current Standards of Care. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 23 (1), 225–238.
- [243] Kuo, H.-P., Ezell, S.A., Hsieh, S., Schweighofer, K.J., Cheung, L.W., Wu, S., et al. (2016) The role of PIM1 in the ibrutinib-resistant ABC subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *American Journal of Cancer Research*. 6 (11), 2489–2501.
- [244] Mologni, L., Magistroni, V., Casuscelli, F., Montemartini, M., and Gambacorti-Passerini, C. (2017) The Novel PIM1 Inhibitor NMS-P645 Reverses PIM1-Dependent Effects on TMPRSS2/ERG Positive Prostate Cancer Cells And Shows Anti-Proliferative Activity in Combination with PI3K Inhibition. *Journal of Cancer*. 8 (1), 140–145.
- [245] Mumenthaler, S.M., Ng, P.Y.B., Hodge, A., Bearss, D., Berk, G., Kanekal, S., et al. (2009) Pharmacologic inhibition of Pim kinases alters prostate cancer cell growth and resensitizes chemoresistant cells to taxanes. *Molecular Cancer Therapeutics*. 8 (10), 2882–2893.
- [246] Mahalingam, D., Espitia, C.M., Medina, E.C., Esquivel, J.A., Kelly, K.R., Bearss, D., et al. (2011) Targeting PIM kinase enhances the activity of sunitinib in renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 105 (10), 1563–1573.
- [247] Hu, X.F., Li, J., Vandervalk, S., Wang, Z., Magnuson, N.S., and Xing, P.X. (2009) PIM-1-specific mAb suppresses human and mouse tumor growth by decreasing PIM-1 levels, reducing Akt phosphorylation, and activating apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 119 (2), 362–375.
- [248] Luszczak, S., Simpson, B.S., Stopka-Farooqui, U., Sathyadevan, V.K., Echeverria, L.M.C., Kumar, C., et al. (2020) Co-targeting PIM and PI3K/mTOR using multikinase inhibitor AUM302 and a combination of AZD-1208 and BEZ235 in prostate cancer. *Scientific Reports*. 10 (1), 14380.
- [249] Crassini, K., Shen, Y., O'Dwyer, M., O'Neill, M., Christopherson, R., Mulligan, S., et al. (2018) The dual inhibitor of the phosphoinositol-3 and PIM kinases, IBL-202, is effective against chronic lymphocytic leukaemia cells under conditions that mimic the hypoxic tumour microenvironment. *British Journal of Haematology*. 182 (5), 654–669.
- [250] Shen, Y., Crassini, K., Fatima, N., O'Dwyer, M., O'Neill, M., Christopherson, R.I., et al. (2020) IBL-202 is synergistic with venetoclax in CLL under in vitro conditions that mimic the tumor microenvironment. *Blood Advances*. 4 (20), 5093–5106.

- [251] Gifford, G., Stevenson, W., and Best, G. (2020) Combination of the dual PIM/PI3-kinase inhibitor IBL-202 and venetoclax is effective in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*. 61 (13), 3165–3176.
- [252] Kennedy, S.P., O'Neill, M., Cunningham, D., Morris, P.G., Toomey, S., Blanco-Aparicio, C., et al. (2020) Preclinical evaluation of a novel triple-acting PIM/PI3K/mTOR inhibitor, IBL-302, in breast cancer. *Oncogene*. 39 (14), 3028–3040.
- [253] Moore, G., Lightner, C., Elbai, S., Brady, L., Nicholson, S., Ryan, R., et al. (2021) Co-Targeting PIM Kinase and PI3K/mTOR in NSCLC. *Cancers*. 13 (9),.
- [254] Burger, M.T., Nishiguchi, G., Han, W., Lan, J., Simmons, R., Atallah, G., et al. (2015) Identification of N-(4-((1R,3S,5S)-3-Amino-5-methylcyclohexyl)pyridin-3-yl)-6-(2,6-difluorophenyl)-5-fluoropicolinamide (PIM447), a Potent and Selective Proviral Insertion Site of Moloney Murine Leukemia (PIM) 1, 2, and 3 Kinase Inhibitor in Clinical Trials for Hematological Malignancies. *Journal of Medicinal Chemistry*. 58 (21), 8373–8386.
- [255] Study of the Safety and Effectiveness of LGH447 and BYL719 in Patients With Relapsed and Refractory Multiple Myeloma, ClinicalTrials.gov. NCT02144038. Abgerufen am 31.05.2021 um 22:12 Uhr

## 12. Danksagung

Abschließend möchte ich mich ausdrücklich bei allen beteiligten Personen bedanken, die diese Dissertation mit ihrer außergewöhnlichen Unterstützung und Mithilfe erst möglich gemacht haben.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Martin Dreyling gilt an dieser Stelle mein ganz besonderer Dank. Mit seiner hervorragenden fachlichen Betreuung und Beratung sowie seinem außerordentlichen Engagements leitete er dieses Projekt mit sicheren Händen. Weiterhin hätte ich mir keine angenehmere Zusammenarbeit vorstellen können.

Weiterhin möchte ich die unentwegte Unterstützung und außergewöhnlich engagierte Betreuung durch Frau Dr. med. Andrea Mayer würdigen. Mit jeder Frage und Problem konnte ich mich an Sie wenden und bekam immer und zu jeder Zeit eine hilfreiche Antwort.

Hervorzuheben ist ebenso Frau Dr. Grit Hutter, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und wertvolle Anregungen zu diesem Projekt beisteuerte.

Mein aufrichtiger Dank gilt ebenso Yvonne Zimmermann, die mich bei der technischen Arbeit im Labor hervorragend unterstützte und durch ihre zuverlässige Organisation für einen reibungslosen Ablauf sorgte.

Und nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die ausgesprochene Unterstützung danken.

## Eidesstattliche Versicherung

Freysoldt, Bianca

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Targeted Therapie beim Mantelzelllymphom unter besonderer

Berücksichtigung des B-Zell-Rezeptors

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

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

Augsburg, 18.07.2022

---

Ort, Datum

Bianca Freysoldt

---

Unterschrift