

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

Molekular gezielte Therapien des Mantelzelllymphoms
-
In-vitro-Wirksamkeit des Phosphoinositid-3-Kinasen-Inhibitors
Copanlisib
im Vergleich mit
selektiven PI3K α -, - β - und - δ -Inhibitoren

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

vorgelegt von
Jochen Arnd
aus
Aachen
2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Dreyling

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralf Schmidmaier
Prof. Dr. Christian Ries
Prof. Dr. Sebastian Kobold

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Anna Zoellner

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der Mündlichen Prüfung: 07.12.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Das Mantelzelllymphom	1
1.1.1	Übersicht, Klinik und Verlauf	1
1.1.2	Morphologie	2
1.1.3	Immunphänotypisierung	3
1.1.4	Genetik	3
1.1.5	Therapieoptionen	6
1.2	Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)	9
1.2.1	PI3K-Signalwege	9
1.2.2	PI3K-Inhibitoren	10
2	Zielsetzung	13
3	Materialien und Methoden	14
3.1	Zellmaterial	14
3.1.1	Bezugsquellen	14
3.1.2	Granta-519	14
3.1.3	Jeko-1	15
3.1.4	Jurkat	16
3.1.5	Maver-1	16
3.1.6	Mino	17
3.1.7	Rec-1	18
3.1.8	Z-138	19
3.1.9	Patientenproben	19
3.2	Inhibitoren	20
3.3	Antikörper	20
3.4	Lösungen, Puffer, kommerzielle Kits, Verbrauchsmaterial	21
3.5	Geräte	25
3.6	Software	25
3.7	Zellkulturarbeiten	27
3.7.1	Bedingungen der Zellkultur	27
3.7.2	Einfrieren von Zelllinien	27
3.7.3	Auftauen von Zelllinien	27
3.7.4	Splitten von Zelllinien	27

3.8	Automatische Zellkonzentrations- und Zellviabilitätsbestimmung (Vi-Cell™)	28
3.9	Metabolische Aktivität (WST-1-Assay)	28
3.10	Apoptose (PE Annexin V- und 7-AAD-Färbung)	29
3.11	Zellzyklusanalyse (PI-Färbung)	30
3.12	Proteinexpression (Western Blot)	30
3.13	Berechnung der Fraction of Product	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Wirkung von Copanlisib	33
4.1.1	Wirkstärke zu verschiedenen Zeitpunkten	33
4.1.2	IC ₅₀ (72 Stunden)	38
4.2	Vergleich von Copanlisib und selektiven PI3K α -, β - und δ -Inhibitoren	38
4.2.1	Analyse viabler Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Vi-Cell™)	39
4.2.2	Errechnung der Fraction of Product	41
4.2.3	Analyse viabler Zellen im zeitlichen Verlauf (Vi-Cell™)	42
4.2.4	Analyse stoffwechselaktiver Zellen (WST-1-Assay)	43
4.3	Durchflusszytometrische Analysen der mit Copanlisib behandelten Zellen	45
4.3.1	Zellzyklusanalyse (PI-Färbung) von Jeko-1 und Granta-519	46
4.3.2	Vergleich der Zellzyklusanalyse von Jeko-1 und Granta-519	47
4.3.3	Apoptoseanalyse (PE Annexin V- und 7-AAD-Färbung) von Jeko-1 und Granta-519	48
4.3.4	Vergleich der Apoptoseanalyse von Jeko-1 und Granta-519	49
4.4	Western Blot-Analysen der mit Copanlisib behandelten Zellen	49
4.4.1	PI3K-Untereinheiten	50
4.4.2	Screening der Signaltransduktionswege	51
4.4.3	Copanlisib-sensitive Proteine	52
4.5	Ergebnisse von Patientenproben	54
4.5.1	Versuchsergebnisse	54
4.5.2	Vergleich von Patientenproben und Zelllinien	56
5	Diskussion	57
5.1	Antiproliferativer Effekt von Copanlisib	57
5.2	Selektive und kombinierte Inhibition von einzelnen PI3K-Isoformen	57

5.3	Effektivität von Copanlisib und kombinierter Inhibition von PI3K α und - δ	60
5.4	Copanlisib in klinischen Studien	67
6	Zusammenfassung	70
7	Abkürzungsverzeichnis	72
8	Literaturverzeichnis	76
9	Bisherige Veröffentlichungen	82
10	Danksagung	83

Die in dieser Arbeit erwähnten Unternehmens-, Produkt- oder Markenbezeichnungen können Marken oder eingetragene Markenzeichen der jeweiligen Eigentümer sein. Die Wiedergabe von Marken- und / oder Warenzeichen in dieser Arbeit berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese als frei von Rechten Dritter zu betrachten seien. Alle erwähnten Marken- und / oder Warenzeichen unterliegen uneingeschränkt den länderspezifischen Schutzbestimmungen und den Besitzrechten der jeweiligen eingetragenen Eigentümer.

1 Einführung

1.1 Das Mantelzelllymphom

1.1.1 Übersicht, Klinik und Verlauf

Das Mantelzelllymphom stellt eine aggressive B-Zell-Lymphomart dar, welche ca. 6 % aller Non-Hodgkin-Lymphome ausmacht. Männer sind mit einem Verhältnis von ca. 3:1 deutlich häufiger betroffen als Frauen und das mediane Lebensalter der Erstdiagnose liegt bei ca. 63 Jahren. (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997) Die Inzidenz der Erkrankung beträgt in Europa ca. 0,5 pro 100.000 Einwohner. (Sant et al., 2010)

Während Anfang der 1970er Jahre die erste Bezeichnung der Krankheit, als zentrozytisches Lymphom, auf die Kiel-Klassifikation zurückging, war die heutige Bezeichnung, Mantelzelllymphom, erstmals zu Beginn der 1990er Jahre in der Literatur zu finden und wurde im weiteren Verlauf auch in die Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms sowie anschließend in die World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues aufgenommen. (Gerard-Marchant et al., 1974) (Banks et al., 1992) (Harris et al., 1994) (Weissinger et al., 1997).

Klinisch zeigen die Patienten bei Diagnosestellung in den meisten Fällen (78 – 92 %) bereits einen fortgeschrittenen Lymphknotenbefall im Ann-Arbor-Stadium III oder IV. Ebenfalls besteht bei über 90 % der Patienten bereits ein extranodaler Befall. Das Knochenmark ist in 58 – 72 % der Fälle betroffen, eine B-Symptomatik bei etwa einem Drittel (31 – 41 %) der Patienten auszumachen und eine LDH-Erhöhung in knapp einem Drittel (29 – 30 %) der Fälle festzustellen. (Zucca et al., 1995) (Tiemann et al., 2005) Weitere häufigere Organmanifestationen betreffen die Milz (35 – 48 %), die Leber (18 – 29 %), den Gastrointestinaltrakt (15 – 18 %) sowie den Waldeyer-Rachenring (12 %). (Norton et al., 1995) (Zucca et al., 1995) (Samaha et al., 1998)

Obwohl die mediane Überlebenszeit bei Patienten in den Stadien III – IV mittlerweile auf fast 5 Jahre deutlich gesteigert werden konnte, ist die Prognose weiterhin schlecht. (Herrmann et al., 2009) Hiervon abzugrenzen ist jedoch die in situ Mantelzellneoplasie, welche sich einerseits ohne Behandlung über deutlich mehr als 10 Jahre stabil zeigen kann, in einigen Fällen jedoch auch zu einem klassischen Mantelzelllymphom entwickeln kann. (Carvajal-Cuenca et al., 2012)

1 Einführung

1.1.2 Morphologie

Histologisch sind beim Mantelzelllymphom die Mantelzonen der Lymphknoten erweitert und verschmolzen. Bei in situ Mantelzellneoplasien ist dies nicht der Fall und der histologische Aufbau der Lymphknoten bleibt erhalten. (Carvajal-Cuenca et al., 2012)

Die Wachstumsmuster des Mantelzelllymphoms innerhalb eines Lymphknotens sind unterteilt in eine mit ca. 81 % am häufigsten vorkommende Variante mit diffusem Wachstum, während ein noduläres Wachstum in ca. 18 % der Fälle und ein Mantelzonen-Wachstum in nur ca. 1 % der Fälle gefunden werden kann. (Argatoff et al., 1997) (Tiemann et al., 2005)

In fast 90 % der Mantelzelllymphome findet sich histologisch die klassische Variante, bestehend aus einer eher monotonen Population an Zellen, welche etwas größer als normale Lymphozyten sind und eine geringe Proliferationsrate aufweisen. Sie enthalten wenig Cytoplasma, welches sich in Giemsa-Färbung schwach bläulich bis schwach grau darstellt. Die leicht bis deutlich irregulären kleinen bis mittelgroßen Nuclei sind gekerbt und enthalten moderat verteiltes Chromatin. Die Nucleoli zeigen sich unauffällig. Verstreut kommen bei dieser Variante auch größere neoplastische Zellen vor. (Tiemann et al., 2005) (Cortelazzo et al., 2012)

Die histologisch kleinzellige Variante ist insgesamt mit einem Vorkommen von unter 5 % selten, findet sich jedoch bei Mantelzelllymphomen mit leukämischer Beteiligung mehr als fünfmal so häufig. Die Zellpopulation ist hierbei sehr gleichmäßig und besteht aus Zellen, welche kleinen Lymphozyten ähneln. Die Nuclei sind klein, teils leicht gekerbt, enthalten dichtes Chromatin und die Nucleoli zeigen sich unauffällig. Auch hier ist die Proliferationsrate niedrig. In geringer Menge finden sich verstreut typische Mantelzellen. (Orchard et al., 2003) (Tiemann et al., 2005) (Cortelazzo et al., 2012)

Eine pleomorphe Variante mit Zellen, welche eine hohe Proliferationsrate, eine moderate Menge an Cytoplasma und eher große Nuclei in verschiedenen Formen, deren Chromatin sich in Hämatoxylin-Eosin-Färbung schwach bis deutlich blau-rot darstellt, aufweisen, tritt in etwas mehr als 5 % der Fälle auf. (Tiemann et al., 2005)

Schließlich kann in weniger als 3 % der Mantelzelllymphome noch eine blastische Variante abgegrenzt werden, in welcher sich eher kleine Blasten mit schmalen Cytoplasmasaum und fein verteiltem Chromatin finden. (Tiemann et al., 2005) Bezüglich mitotischem Index und Ki-67-Index liegen die Werte der Gruppe mit blastischer und pleomorpher Variante signifikant über denen der Gruppe der anderen

1 Einführung

Varianten. Obwohl zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben nachgewiesen werden kann, finden sich im Gegensatz zur letzteren Gruppe keine Patienten mit blastischer oder pleomorpher Variante, welche ein Langzeitüberleben von 5 Jahren oder mehr aufweisen. (Tiemann et al., 2005)

1.1.3 Immunphänotypisierung

Neben den für B-Zellen üblichen Oberflächenantigenen CD19, CD20 und CD22 zeigen sich Mantelzelllymphomzellen gewöhnlich positiv für FMC7 und das für T-Zellen übliche CD5 sowie negativ für CD10 und CD23. Zu beachten ist dabei, dass sich diese Kombination der Oberflächenmarker nicht in jedem Fall präsentiert und es gerade bei CD5, CD10, CD23 und FMC7 in jeweils ca. 10 – 20 % der Fälle abweichende Varianten gibt. (Gao et al., 2009)

1.1.4 Genetik

Charakteristisch für das Mantelzelllymphom ist die genetische Translokation $t(11;14)(q13;q32)$, welche sensitiv per Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) nachgewiesen werden kann. (Raffeld et al., 1991) (Belaud-Rotureau et al., 2002) Durch diese Chromosomenmutation wird der Genlocus für Cyclin D1 von Chromosom 11 in die Nähe und unter den Einfluss der IgH-Genregion auf Chromosom 14 gebracht, wodurch eine Überexpression von Cyclin D1 die Folge ist. (Erikson et al., 1984) (Komatsu et al., 1994) Dabei zeigt sich, dass die Menge an Cyclin D1 in Mantelzelllymphomzellen mit deren Zellproliferation korreliert. (Shakir et al., 2008) Bis heute sind vielfältigste CDK-abhängige und -unabhängige Signalwege mit Beteiligung von Cyclin D1 entdeckt und deren Beitrag an der onkogenen Wirkung über verschiedenste Mechanismen beschrieben worden. In Mantelzelllymphom- und anderen Tumorzellen konnten mittlerweile über 130 Proteine identifiziert werden, welche mit Cyclin D1 interagieren. (Jirawatnotai et al., 2011) (Musgrove et al., 2011) Die Entstehung eines Mantelzelllymphoms kann jedoch nicht alleine durch die Folgen der translokationsbedingten Cyclin D1-Überexpression erklärt werden. In transgenen Mausmodellen, in welchen Cyclin D1 auf gleiche Weise wie beim Mantelzelllymphom überexprimiert wird, konnte keine Lymphomentstehung beobachtet werden. (Bodrug et al., 1994) Auch bei gesunden Menschen wurden bereits vereinzelte periphere B-Zellen mit $t(11;14)(q13;q32)$ -Translokation nachgewiesen. (Lecluse et al., 2009)

1 Einführung

Möglicherweise handelt es sich dabei um klonale Zellen aus in situ Mantelzellneoplasien. (Carvajal-Cuenca et al., 2012)

In Mantelzelllymphomzellen können ebenfalls zahlreiche sekundäre genetische Mutationen, von denen eine zusätzliche onkogene Wirkung ausgeht, gefunden werden. Am häufigsten zeigen sich dabei Mutationen, welche die Gene *ATM* (Serin-Proteinkinase ATM), *CCND1* (Cyclin D1) und *TP53* (Protein p53) betreffen, wobei *ATM*-Mutationen vermutlich zu einem frühen Zeitpunkt der Pathogenese entstehen, während *TP53*-Mutationen im weiteren Verlauf auftreten. Das Auftreten letzterer steht dabei im Zusammenhang mit einem kürzeren Gesamtüberleben. (Bea et al., 2013)

Die typischen durch sekundäre genetische Änderungen verursachten Genderegulierungen betreffen Gene aus dem Bereich der Zellproliferation, DNA-Reparatur, Aufrechterhaltung der chromosomalen Stabilität, zellulären Homöostase und Apoptose. (Salaverria et al., 2007) Weiterhin wurde herausgefunden, dass Mantelzelllymphome, deren Zellen Mutationen der Gene *NOTCH1* oder *NOTCH2* aufweisen, was mit einer Häufigkeit von jeweils ca. 5 % der Fälle auftritt, deutlich häufiger der pleomorphen oder blastischen Variante angehören und mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben einhergehen. (Bea et al., 2013)

Mittlerweile wurden auch Signalwege in Mantelzelllymphomzellen entdeckt, welche an zahlreichen Stellen dereguliert sind. Dies betrifft unter anderem den WNT- sowie den PI3K/Akt-Signalweg. (Rizzatti et al., 2005) Vor allem auf letzteren wird in den folgenden Kapiteln noch genauer eingegangen.

Interessanterweise ist bekannt, dass auch Mantelzelllymphome ohne Cyclin D1-Überexpression existieren, welche aber ansonsten deutliche Ähnlichkeiten in sekundären genetischen Änderungen, Genexpressionsprofil und klinischem Verlauf zeigen. In diesen seltenen Fällen konnte statt der Cyclin D1- eine Cyclin D2- oder Cyclin D3-Überexpression festgestellt werden. (Fu et al., 2005) (Salaverria et al., 2007) Weitere wichtige genetische Marker wurden in Form der Expression von SOX11 sowie des Mutationsstatus des IGHV-Gens gefunden. Eine SOX11-Expression sowie ein zu maximal 3 % mutiertes IGHV-Gen stellen dabei unabhängige signifikante Risikofaktoren bezüglich des 5-jährigen Gesamtüberlebens dar. (Navarro et al., 2012)

1 Einführung

Kombiniert ergeben sich folgende Ergebnisse:

<u>5-jähriges Gesamtüberleben</u>	SOX11 positiv	SOX11 negativ
<i>IGHV</i> unmutiert ($\leq 3\%$)	38 %	48 %
<i>IGHV</i> mutiert ($> 3\%$)	42 %	73 %

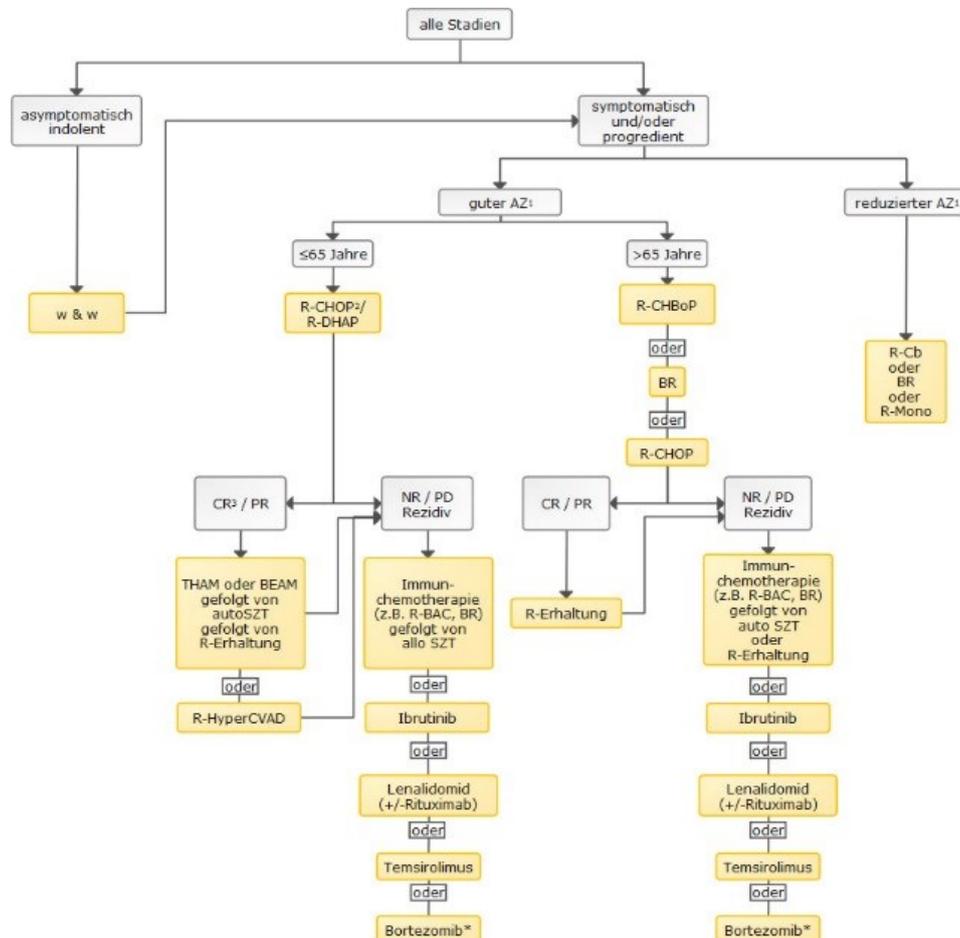
Tabelle 1: 5-jähriges Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der SOX11-Expression sowie vom Umfang der Mutation des IGHV-Gens nach (Navarro et al., 2012)

Die Kombination SOX11 positiv und *IGHV* unmutiert bzw. schwach mutiert tritt hierbei am häufigsten auf, gefolgt von SOX11 negativ und *IGHV* stärker mutiert. Die beiden übrigen Kombinationen sind deutlich seltener. (Navarro et al., 2012) (Bea et al., 2013) Auch konnte bei Patienten, bei denen Mantelzelllymphomzellen im peripheren Blut nachgewiesen wurden, gesehen werden, dass ein nodaler Befall mit einem kaum mutierten *IGHV*-Gen einhergeht, während in der gegenübergestellten Gruppe, ohne nodalen Befall, Mutationen von teils über 10 % gefunden werden können. (Orchard et al., 2003) Weiterhin interessant ist, dass Mantelzelllymphomzellen mit unmutiertem *IGHV* in ihrem Genexpressionsprofil eher naiven B-Zellen ähneln, während bei mutiertem *IGHV* das Genexpressionsprofil dem von B-Gedächtniszellen näherkommt. (Navarro et al., 2012)

1 Einführung

1.1.5 Therapieoptionen

Die Therapie des Mantelzelllymphoms steht unter ständiger Anpassung an Ergebnisse neuer Studien. (Dreyling et al., 2014) Eine aktuelle Übersicht über Möglichkeiten der studiengerechten Therapie findet sich in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.:



Legende:

¹ AZ – Allgemeinzustand;

² Therapie:

allo SZT – allogene Stammzelltransplantation,

auto SZT – autologe Stammzelltransplantation,

BEAM – Carmustin/Etoposid/Cytarabin/Melphalan,

BR – Rituximab/Bendamustin,

R-BAC - Rituximab/Bendamustin/Cytarabin

R-Cb – Rituximab/Chlorambucil,

R-CHOP - Rituximab/Cyclophosphamid/Doxorubicin/Vincristin/Prednison,

R-CHBoP - Rituximab/Cyclophosphamid/Doxorubicin/Bortezomib/Prednison,

R-DHAP – Dexamethason/hochdosiertes Cytarabin/Cisplatin,

R-Erhaltung – Rituximab Erhaltung,

R-HAD – Rituximab/hochdosiertes Cytarabin/Dexamethason,

R-HyperCVAD – Rituximab/Cyclophosphamid/Vincristin/Doxorubicin/Dexamethason,

THAM – Hochdosistherapie mit Ganzkörperbestrahlung (Total Body Irradiation)/Cytarabin/Melphalan,

w&w – abwarten (watch & wait);

³ CR – komplette Remission, NR – keine Remission (Non Response), PR – partielle Remission

* Zulassung liegt nur in der Schweiz vor

Abbildung 1: Schrittweises therapeutisches Vorgehen bei Mantelzelllymphomen, Stand: April 2019 (aus den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinischen Onkologie e.V. (einschließlich Legende))

1 Einführung

In der Erstlinientherapie wurde dabei etabliert, Chemotherapien in Kombination mit dem Anti-CD20-Antikörper Rituximab durchzuführen. Beispielsweise konnte gegenüber einer Therapie mit CHOP durch Hinzunahme des Antikörpers sowohl die Rate der Komplettremissionen als auch die Zeit bis zum Therapieversagen und die Gesamtansprechrate signifikant gesteigert werden. Letztere erreicht mit R-CHOP-Therapie einen Wert von 94 %. (Lenz et al., 2005) Ein Problem stellt jedoch weiterhin das frühzeitige Erkennen der zu 10–15 % auftretenden indolenten Formen des Mantelzelllymphoms dar, bei welchen eine watch and wait-Strategie ohne einen Nachteil für das Gesamtüberleben verfolgt werden kann. Obwohl sich durch das klinische Erscheinungsbild sowie unter Hinzunahme der Analyse von Biomarkern Hinweise ergeben können, ist eine sichere Diagnose dieser Untergruppe der Patienten weiterhin schwierig. (Martin et al., 2009) (Dreyling et al., 2014)

Während bei einer Erstlinientherapie noch ein hohes Ansprechen von deutlich über 90 % und ein progressionsfreies Überleben von durchschnittlich mehreren Jahren erreicht werden kann, können diese Werte in Folgetherapien nach Rückfällen nicht mehr erzielt werden. (Goy et al., 2011) Eine relativ erfolgsversprechende Therapie nach mehrfachen Rückfällen stellt bei geeigneten Patienten noch die nicht-ablative allogene Stammzelltransplantation dar, durch welche auch unter diesen Umständen in über 80 % der Fälle ein progressionsfreies 3-jähriges Überleben erreicht werden kann. (Khouri et al., 2003)

Durch das gewachsene molekulare Verständnis der Erkrankung hat sich in den letzten Jahren die Therapieoption der molekular gezielten Therapien aufgetan, welche bereits Einzug in viele klinische Studien gefunden haben und derzeit vor allem als Alternative für rückfällige Patienten gesehen werden, welche für eine Stammzelltransplantation nicht geeignet scheinen. Ein weiterer zukünftiger Einsatzbereich dieser Therapien könnte durch ihre Wirksamkeit bei gleichzeitig tolerablen Nebenwirkungen auch in der Erstlinientherapie von Patienten mit sehr schlechtem Allgemeinzustand liegen. (Dreyling et al., 2014) Bei dem in der Leitlinie dargestellten Wirkstoff Ibrutinib handelt es sich um einen Inhibitor von BTK (Bruton-Tyrosinkinase), welcher als Imbruvica® für Erwachsene bei rezidivierter oder refraktärer Erkrankung zugelassen ist. Für diese Indikation ist ebenso Temsirolimus, ein selektiver Inhibitor von mTOR (mammalian target of rapamycin), als Torisel® und Lenalidomid, welches durch Bindung an das Cereblon-Protein die Ubiquitinierung der lymphoiden Transkriptionsfaktoren Aiolos und Ikaros einleitet, als Revlimid® zugelassen. Mit Bortezomib, einem

1 Einführung

Proteasom-Inhibitor, ist mittlerweile ein molekular zielgerichteter Wirkstoff verfügbar, welcher als Velcade® in Kombination mit Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin und Prednison sogar für die Erstlinientherapie Erwachsener zugelassen ist, welche nicht für eine hämatopoetische Stammzelltransplantation geeignet sind. (Informationen jeweils aus dem Anhang I der European Public Assessment Reports der European Medicines Agency)

1 Einführung

1.2.2 PI3K-Inhibitoren

Mittlerweile sind zahlreiche Inhibitoren für PI3K und deren einzelne Untereinheiten bekannt. Die folgenden Inhibitoren kommen in den Versuchen der vorliegenden Arbeit zum Einsatz.

1.2.2.1 Selektive PI3K-Inhibitoren

A66

A66 stellt einen selektiven PI3K p110 α -Inhibitor dar. Dabei liegt der IC₅₀-Wert der anderen PI3K p110-Untereinheiten um mindestens den Faktor 39 höher. Unter weiteren getesteten PI3K und verwandten Kinasen fielen bei PI3K C2 β und PI4K β die Quotienten mit 14 bzw. 7 am geringsten aus. Im Vergleich zu PIK-75, aus derselben Inhibitorgruppe, besitzt A66 zwar die geringere Potenz, zeichnet sich jedoch durch eine deutlich höhere Spezifität bezüglich der Untereinheiten aus. (Jamieson et al., 2011)

	p110 α	p110 β	p110 γ	p110 δ
IC ₅₀	32 nM	> 12,5 μ M	3,48 μ M	> 1,25 μ M

Tabelle 2: IC₅₀-Werte des Inhibitors A66 bezogen auf die verschiedenen PI3K p110-Untereinheiten (Quelle: Hersteller / <http://www.selleckchem.com/products/a66.html>)

TGX-221

TGX-221 stellt einen PI3K p110 β -Inhibitor dar, welcher durch Analyse und sukzessive Modifikation der für die Inhibition von PI3K benötigten Schlüsselstrukturen des PI3K-Inhibitors LY294002 entwickelt wurde. Im Vergleich zu den zuvor gefundenen Molekülen TGX-25, TGX-40 und TGX-126 zeigt TGX-221 dabei die mit Abstand größte Spezifität gegenüber der Untereinheit p110 β . Der IC₅₀-Wert der anderen PI3K p110-Untereinheiten liegt hierbei um mindestens den Faktor 20 höher. Bei weiteren getesteten Kinasen wurden Quotienten von über 2.000 gemessen. (Jackson et al., 2005)

	p110 α	p110 β	p110 γ	p110 δ
IC ₅₀	5 μ M	5 nM	> 10 μ M	0,1 μ M

Tabelle 3: IC₅₀-Werte des Inhibitors TGX-221 bezogen auf die verschiedenen PI3K p110-Untereinheiten (Quelle: Hersteller / <http://www.selleckchem.com/products/TGX-221.html>)

1 Einführung

Idelalisib

Der selektive PI3K p110 δ -Inhibitor Idelalisib findet als Zydelig® bereits Anwendung als Monotherapie bei der Behandlung erwachsener Patienten mit follikulärem Lymphom, welches refraktär nach zwei vorausgegangenen Therapielinien ist. In Kombination mit Rituximab oder Ofatumumab besteht weiterhin eine Zulassung zur Behandlung einer Chronischen Lymphatischen Leukämie bei erwachsenen Patienten mit mindestens einer vorangegangenen Therapie. Liegt im Rahmen einer CLL eine 17p-Deletion oder TP53-Mutation vor, ist bei erwachsenen Patienten, für die keine andere Therapie geeignet ist, in beschriebener Kombination auch der Einsatz als Erstlinientherapie möglich. (Informationen aus dem Anhang I der European Public Assessment Reports der European Medicines Agency) Bezüglich seiner Selektivität zeichnet sich Idelalisib durch eine um den Faktor 36 größere Spezifität zur p110 δ -Untereinheit im Vergleich zu den anderen p110-Untereinheiten aus. Bei Inhibitionstests mit verwandten Kinasen fanden sich die geringsten IC₅₀-Quotienten bei der Klasse III PI3K hVPS34 und der Klasse IV PI3K DNA-PK mit Werten von 391 bzw. 2.692. In einem Screening von über 400 nicht verwandten Kinasen konnte selbst bei einer Konzentration von 10 μ M keine Inhibition detektiert werden. (Lannutti et al., 2011)

	p110 α	p110 β	p110 γ	p110 δ
IC ₅₀	820 nM	565 nM	89 nM	2,5 nM

Tabelle 4: IC₅₀-Werte des Inhibitors Idelalisib bezogen auf die verschiedenen PI3K p110-Untereinheiten (Quelle: Hersteller / <http://www.selleckchem.com/products/CAL-101.html>)

1.2.2.2 Copanlisib

Copanlisib ist ein selektiver PI3K p110 α - und PI3K p110 δ -Inhibitor, welcher per Hochdurchsatz-Screening-Verfahren entdeckt wurde und bei dem sich die IC₅₀-Werte gegenüber anderen p110-Untereinheiten mindestens um den Faktor 5 größer darstellen. Bezüglich über 220 weiterer getesteter Kinasen liegt der IC₅₀-Quotient bei 64 oder höher. (Liu et al., 2013) Copanlisib ist als Aliqopa® in den USA nach einem beschleunigten Zulassungsverfahren bereits zur Therapie erwachsener Patienten mit rezidiviertem follikulärem Lymphom und mindestens zwei vorangegangenen systemischen Therapien zugelassen. (Informationen aus dem Approval Letter der U. S. Food and Drug Administration) Eine Zulassung durch die European Medicines Agency liegt bisher nicht vor. Weiterhin durchläuft der Inhibitor aktuell in Kombinationsanwendung mit Rituximab bzw. Standard-Immunchemotherapie

1 Einführung

klinische Studien der Phase III, welche neben Patienten mit follikulärem Lymphom Grad 1-2-3a auch Patienten mit kleinzelligem lymphozytischem Lymphom, lymphoplasmozytischem Lymphom / M. Waldenström und Marginalzonenlymphom, jeweils im Rezidiv, einschließen. (NCT02367040 und NCT02626455)

	p110 α	p110 β	p110 γ	p110 δ
IC ₅₀	0,5 nmol/L	3,7 nmol/L	6,4 nmol/L	0,7 nmol/L

Tabelle 5: IC₅₀-Werte des Inhibitors Copanlisib bezogen auf die verschiedenen PI3K p110-Untereinheiten (Quelle: Hersteller / <http://www.chronoatrials.com>)

2 Zielsetzung

Obwohl die mediane Überlebenszeit für Patienten mit Mantelzelllymphom in den letzten Jahren deutlich gesteigert werden konnte, zeigt sich weiterhin eine insgesamt schlechte Prognose. (Herrmann et al., 2009) Eine große Herausforderung stellt vor allem die Therapie von Patienten mit refraktärer Erkrankung beziehungsweise im Rezidiv dar. (Goy et al., 2011) Abgesehen von einer Stammzelltransplantation sind in diesem Zusammenhang mittlerweile molekular zielgerichtete Inhibitoren in den Vordergrund gerückt, welche auf längere Sicht eventuell auch in die Erstlinientherapie Einzug halten könnten. (Khouri et al., 2003) (Dreyling et al., 2014) (Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinischen Onkologie e.V., Stand Juni 2017)

Ein vielversprechendes Ziel für die neuartigen Inhibitoren stellt dabei der PI3K-Signalweg dar, welcher in Mantelzelllymphomzellen dereguliert ist und an deren Wachstum, Proliferation und Überleben er, unter anderem durch eine Unterstützung der für die Krankheit typischen Cyclin D1-Überexpression, beteiligt ist. (Rizzatti et al., 2005) (Vanhaesebroeck et al., 2012)

Von besonderem Interesse ist dabei die Inhibition der PI3K δ -Untereinheit, welche spezifisch in Leukozyten vorkommt und in Mantelzelllymphomzellen deutlich überexprimiert auftritt, sowie die Inhibition der PI3K α -Untereinheit, welche in Rezidiven vermehrt exprimiert detektiert wurde. (Okkenhaug, 2013) (Iyengar et al., 2013)

Bei der Untersuchung von PI3K-Inhibitoren im Zusammenhang mit anderen Krebsarten ist zuletzt auch die Bedeutung des Wechselspiels zwischen PI3K und Ras in der Hinsicht in den Vordergrund gerückt, dass Ras nicht nur, wie häufig beschrieben, ein Aktivator von PI3K sein kann, sondern eine wechselseitige Beeinflussung stattfindet. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass neben der Inhibition des Akt-Signalwegs auch der Inhibition des dem Ras nachgeschalteten MAP-Kinase-Wegs eine entscheidende Bedeutung beim Induzieren der Apoptose zukommt. (Will et al., 2014)

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen soll nun in dieser Arbeit sowohl die Wirkstärke als auch die Wirkungsart des neuen PI3K α - und - δ -Inhibitors Copanlisib in vitro an den Mantelzelllymphomzelllinien Granta-519, Jeko-1, Maver-1, Mino, Rec-1 und Z-138 untersucht, mit selektiven PI3K α -, - β - und - δ -Inhibitoren sowie Kombinationen dieser verglichen und eine mögliche Bedeutung der Ergebnisse für zukünftige Therapieformen erörtert werden. Als Kontrollzelllinie dient in den Experimenten die Akute Lymphatische T-Zell-Leukämie-Zelllinie Jurkat.

3 Materialien und Methoden

3.1 Zellmaterial

3.1.1 Bezugsquellen

Die verwendeten Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA) und der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) des Leibniz-Instituts (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

3.1.2 Granta-519

Bei Granta-519 handelt es sich um eine aus peripherem Blut gewonnene MCL-Zelllinie mit meist hypodiploidem Chromosomensatz, unter anderem typischer $t(11;14)(q13;q32)$ -Translokation sowie positiver Antigen-Expression für einige B-Zell-Antigene.

Klassifikation	Mantelzelllymphom
Gewinnung	aus peripherem Blut einer 58 Jahre alten weiblichen Patientin
Antigen-Expression	CD3-, CD5-, CD10-, CD19+, CD20+, CD23+
Epstein-Barr-Virus-Status	positiv
Cytogenetische Charakterisierung	44(39-44), XX, -12, -17, -18, +mar, hypodiploid (8 % Polyploiditätsrate)
Chromosomale Änderungen	add(1)(p22), del(3)(p14p23), i(8p), i(8q), add(9)(p22)x1-2, t(11;14)(q13;q32), add(13)(p12), add(18)(q21)

Tabelle 6: Eigenschaften der Zelllinie Granta-519 (Fogli et al., 2015) (Drexler et al., 2002) (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) (www.dsmz.de))

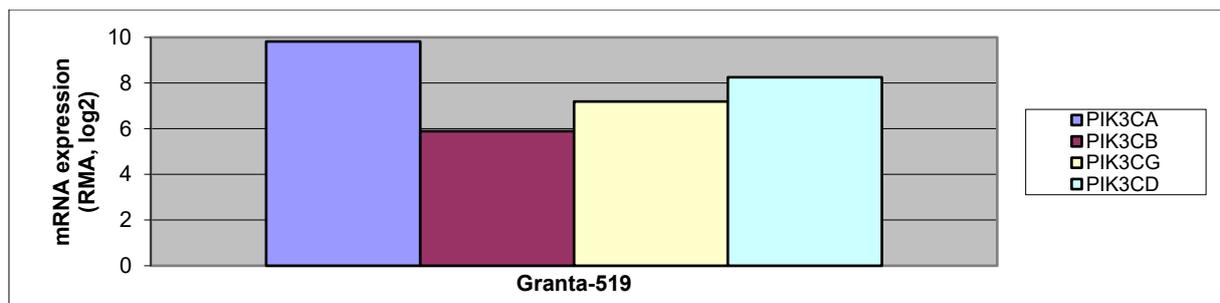


Abbildung 3: mRNA-Expression der PI3K p110-Gene in der Zelllinie Granta-519 (Broad Institute (www.broadinstitute.org/ccle/home))

3 Materialien und Methoden

3.1.3 Jeko-1

Bei Jeko-1 handelt es sich um eine aus peripherem Blut gewonnene MCL-Zelllinie mit meist hypertriploidem Chromosomensatz, zahlreichen chromosomalen Änderungen sowie positiver Antigen-Expression für einige B-Zell-Antigene.

Klassifikation	Mantelzelllymphom
Gewinnung	aus peripherem Blut einer 78 Jahre alten weiblichen Patientin
Antigen-Expression	CD3-, CD5+, CD10+, CD19+, CD20+, CD23-
Epstein-Barr-Virus-Status	negativ
Cytogenetische Charakterisierung	70-78, XXXX, +X, +1, +2, +2, +4, +6, +7, -8, +10, +11, -12, -12, +13, +14, +15, -17, +18, -19, -19, -22, +2-4mar, hypertriploid (geringe Polyploiditätsrate)
Chromosomale Änderungen	del(X)(p21)/add(X)(p11.2)x2, der(X)t(X;11)(q26-28;q13)t(11;?10)(q24;?p12), der(1)t(1;2)(p21;q22)x2, add(2)(q2?), del(2)(q11), add(3)(q27), der(5)t(5;12)(p15;p11-12)x2, add(6)(p21)x2, der(6;13)(p10;q10)x1-2, der(7)t(4;7)(q2?6;q32.1)x2, add(9)(p2?), der(9)t(9;14)(q34-35;q32-33)x2, der(10)t(10;11)(p12;?)x2, der(11)t(11;14)(q13;q32)x1-2, add(13)(p11), der(13)t(13;?)(p11;?)t(?;13)(?;q11), add(14)(p11), der(14)t(14;17)(p12;q11)t(14;6)(q24;?p11), der(14)t(11;14)(?;p11)t(11;?8)(?;?), del(16)(p11), add(17)(p11), ins(19;12)(q13.1;q13.2q2?4)x2

Tabelle 7: Eigenschaften der Zelllinie Jeko-1 (Fogli et al., 2015) (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) (www.dsmz.de))

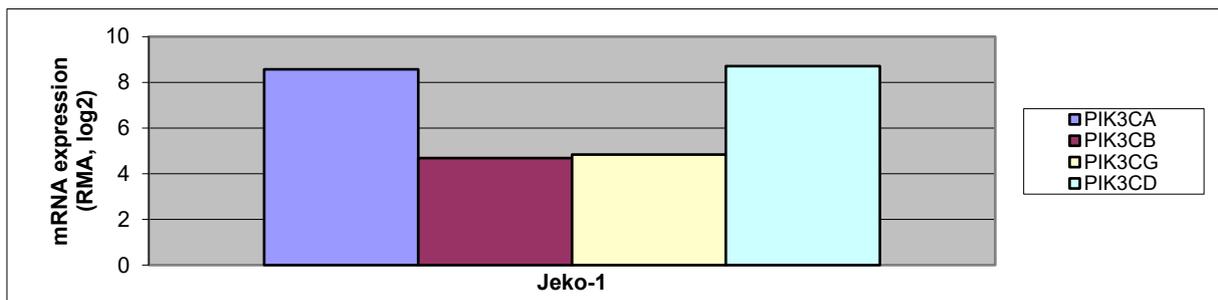


Abbildung 4: mRNA-Expression der PI3K p110-Gene in der Zelllinie Jeko-1 (Broad Institute (www.broadinstitute.org/ccl/home))

3 Materialien und Methoden

3.1.4 Jurkat

Bei Jurkat handelt es sich um eine aus peripherem Blut gewonnene Akute Lymphatische T-Zell-Leukämie-Zelllinie mit meist hypotetraploidem Chromosomensatz sowie positiver Antigen-Expression für einige T-Zell-Antigene.

Klassifikation	Akute Lymphatische T-Zell-Leukämie
Gewinnung	aus peripherem Blut eines 14 Jahre alten männlichen Patienten
Antigen-Expression	CD3+, CD5+, CD19-
Epstein-Barr-Virus-Status	negativ
Cytogenetische Charakterisierung	87(78-91), XX, -Y, -Y, -5, -16, -17, -22, hypotetraploid (7,8 % Polyploiditätsrate)
Chromosomale Änderungen	add(2)(p21)/del(2)(p23)x2

Tabelle 8: Eigenschaften der Zelllinie Jurkat (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) (www.dsmz.de))

3.1.5 Maver-1

Bei Maver-1 handelt es sich um eine aus peripherem Blut gewonnene MCL-Zelllinie mit meist hypodiploidem Chromosomensatz, zahlreichen chromosomalen Änderungen sowie für Mantelzelllymphomzellen typischer Antigen-Expression.

Klassifikation	Mantelzelllymphom
Gewinnung	aus peripherem Blut eines 77 Jahre alten männlichen Patienten
Antigen-Expression	CD3-, CD5+, CD10-, CD19+, CD20+, CD23-
Epstein-Barr-Virus-Status	negativ
Cytogenetische Charakterisierung	40(34-42), XY, -8, -12, -13, -14, -17, -22, hypodiploid (10 % Polyploiditätsrate)
Chromosomale Änderungen	der(1)dup(1)(p34p36)t(1;3)(p36;q21), der(3)del(3)(p13)t(3;14)(q27;q12), der(4)t(4;8)(q35;q24), der(6)t(6;14)(q13;q11)t(14;11)(q32;q13), der(8)dup(8)(q22q24)ins(8;7)(q24;?), ider(9)(q10)t(8;9)(q24;q34-35)t(8;22)(q24;q11), ider(9)del(9)(p21), der(10)t(8;10)(q13;p12), der(11)t(11;14)(q13;q32), der(12)t(12;12)(p13;q24)?del(12)(p11q11), der(14)t(3;14)(q13;q12), der(15)t(11;15)(p13;p11)dup(15)(q11q25), der(21)t(13;21)(q31;p11), der(22)t(18;22)(q22q23)dup(18)(q22q23) t(18;11)(q23;p13)

Tabelle 9: Eigenschaften der Zelllinie Maver-1 (Fogli et al., 2015) (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) (www.dsmz.de))

3 Materialien und Methoden

3.1.6 Mino

Bei Mino handelt es sich um eine aus peripherem Blut gewonnene MCL-Zelllinie mit meist hypertriploidem Chromosomensatz, zahlreichen chromosomalen Änderungen sowie für Mantelzelllymphomzellen typischer Antigen-Expression.

Klassifikation	Mantelzelllymphom
Gewinnung	aus peripherem Blut einer 64 Jahre alten weiblichen Patientin
Antigen-Expression	CD3-, CD5+, CD10-, CD19+, CD20+, CD23-
Epstein-Barr-Virus-Status	negativ
Cytogenetische Charakterisierung	70-75, XXY, -3, -5, +7, +14, -16, -16, -18, -19, +20, +20, -21, +4mar, hypertriploid
Chromosomale Änderungen	del(3)(q13)x1-2, del(6)(22), i(7)(p10), der(8)t(8;14)(q24;q32)t(14;11)(q32;q13)x2, t(8;14)(q24;q32)x2, der(11)t(11;14)(q2?:q11)t(14;8)(q32;q24)x1-2, der(11)t(11;14)(q13;q32)x2, add(14)(q21), der(13)t(3;13)(q25;q32)x1-2

Tabelle 10: Eigenschaften der Zelllinie Mino (Fogli et al., 2015) (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) (www.dsmz.de))

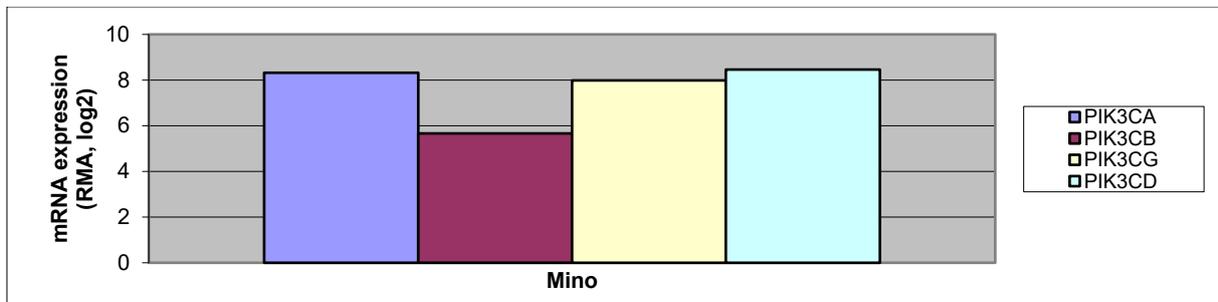


Abbildung 5: mRNA-Expression der PI3K p110-Gene in der Zelllinie Mino (Broad Institute (www.broadinstitute.org/ccl/home))

3 Materialien und Methoden

3.1.7 Rec-1

Bei Rec-1 handelt es sich um eine aus einem peripheren Lymphknoten gewonnene MCL-Zelllinie mit meist nahezu diploidem Chromosomensatz, zahlreichen chromosomalen Änderungen sowie positiver Antigen-Expression für einige B-Zell-Antigene.

Klassifikation	Mantelzelllymphom
Gewinnung	aus peripherem Lymphknoten eines 57 Jahre alten männlichen Patienten
Antigen-Expression	CD3-, CD5-, CD10-, CD19+, CD20+, CD23-, FMC7-
Epstein-Barr-Virus-Status	negativ
Cytogenetische Charakterisierung	41-47, XY/XXY, -2, -8, +11, +12, -13, -22, nahezu diploid (10 % Polyploiditätsrate)
Chromosomale Änderungen	add(5)(p15), i(7q), add(9)(p22), der(9)t(9;17)(q3?1;q11-12), add(10)(q24-q25), add(11)(q11), t(11;14)(q13;q32), add(12)(q22), der(12)t(8;12)(q11;p12), der(12)t(12;16)(p11;p11), der(16)t(16;17)(p11;?q25)t(2;16)(p1?2;q2?1), der(16)t(16;22)(p13;q11), add(17)(q25)x2

Tabelle 11: Eigenschaften der Zelllinie Rec-1 (Fogli et al., 2015) (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) (www.dsmz.de))

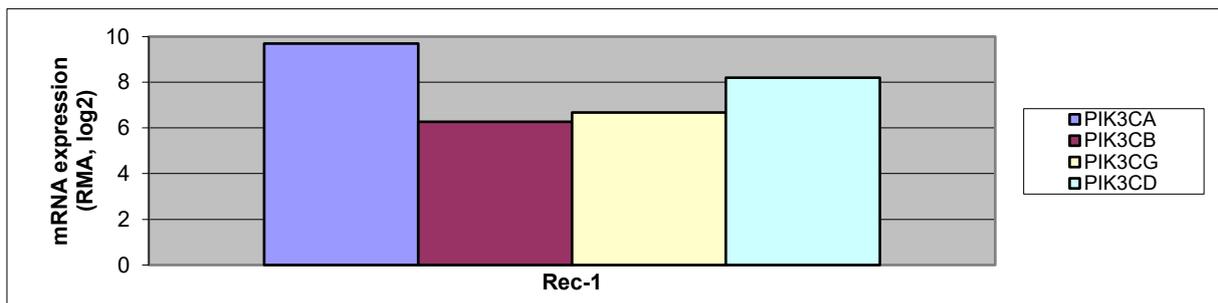


Abbildung 6: mRNA-Expression der PI3K p110-Gene in der Zelllinie Rec-1 (Broad Institute (www.broadinstitute.org/ccle/home))

3 Materialien und Methoden

3.1.8 Z-138

Bei Z-138 handelt es sich um eine aus Knochenmark gewonnene MCL-Zelllinie mit meist hyperdiploidem Chromosomensatz, unter anderem typischer t(11;14)(q13;q32)-Translokation sowie positiver Antigen-Expression für einige B-Zell-Antigene.

Klassifikation	Mantelzelllymphom, blastoide Variante
Gewinnung	aus Knochenmark eines 70 Jahre alten männlichen Patienten
Antigen-Expression	CD3-, CD5-, CD10-, CD19+, CD20+, CD23+, FMC7-
Epstein-Barr-Virus-Status	negativ
Cytogenetische Charakterisierung	48, XY, +12, +13, hyperdiploid (4 % Polyploiditätsrate)
Chromosomale Änderungen	t(11;14)(q13;q32), del(5)(p15), der(9)t(9;?), der(14)t(8;14?), add(17p)

Tabelle 12: Eigenschaften der Zelllinie Z-138 (Fogli et al., 2015) (Estrov et al., 1998)

3.1.9 Patientenproben

Patientenproben von vier Patienten wurden im Rahmen der klinischen Routine asserviert. Für die durchgeführten Untersuchungen liegt ein Votum der Ethikkommission vor unter dem Zeichen 223-14 und dem Titel „Der Informative Patient – Etablierung und Evaluation prognostisch / prädikativer Marker bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien“.

3 Materialien und Methoden

3.2 Inhibitoren

A66 (PI3K p110 α -Inhibitor)	Selleckchem (Houston, TX, USA)
TGX-221 (PI3K p110 β -Inhibitor)	Selleckchem (Houston, TX, USA)
Idelalisib, (CAL-101, GS-1101) (PI3K p110 δ -Inhibitor)	Selleckchem (Houston, TX, USA)
Copanlisib (BAY 80-6949, Bay236) (PI3K p110 α - und - β -Inhibitor)	Bayer Healthcare (Leverkusen, Deutschland)

3.3 Antikörper

Actin – Primärer Antikörper – Kaninchen	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
4E-BP1 – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Akt – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
GAPDH – Primärer Antikörper – Maus	Santa Cruz Biotechnology (Dellas, TX, USA)
GSK3 α – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
GSK3 β – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Kaninchen – Sekundärer Antikörper – HRP	Promega (Madison, WI, USA)
Maus – Sekundärer Antikörper – HRP	Promega (Madison, WI, USA)
mTor – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
p38 MAPK – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
p44/42 MAPK (Erk1/2) – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Phospho-4E-BP1 (Ser65) – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Phospho-Akt (Ser473) – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Phospho-GSK3 α (Ser21) – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)

3 Materialien und Methoden

Phospho-GSK3 β (Ser9) – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Phospho-mTor (Ser2481) – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Phospho-p90RSK (Thr359/Ser363) – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Phospho-PDK1 (Ser241) – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Phospho-Raptor (Ser792) – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Phospho-Rictor (Thr1135) – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
PDK1 – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
PI3 Kinase p110 α – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
PI3 Kinase p110 β – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
PI3 Kinase p110 γ – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
PIK3CD – Primärer Antikörper – Kaninchen	OriGene Technologies (Rockville, MD, USA)
Raptor – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Rictor – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
RSK1 – Primärer Antikörper – Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)

3.4 Lösungen, Puffer, kommerzielle Kits, Verbrauchsmaterial

Albumin Fraktion V 5 %:	vor Ort hergestellt
- 100 ml TBST	vor Ort hergestellt
- 5 g Albumin Fraktion V	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- 1 Spatelspitze Natriumazid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

3 Materialien und Methoden

Annexin- und 7-AAD-Reagenzien-Kit: PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
APS 10 %:	vor Ort hergestellt
- 10 ml Aqua dest.	
- 1 g Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Bromphenolblau-Lösung (gesättigt):	vor Ort hergestellt
- Aqua dest. 1 ml	
- Bromphenolblau zur Sättigung	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Cryo Tubes: Nunc Biobanking and Cell Culture Cryogenic Tubes – 1.8 mL – l: 48 mm – d: 12.5 mm – Internal	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
DPBS	PAN-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
ECL-Lösung:	vor Ort hergestellt
- 3 ml Solution A	vor Ort hergestellt
- 300 µl Solution B	vor Ort hergestellt
- 900 nl H ₂ O ₂ -Lösung	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Einfriermedium:	vor Ort hergestellt
- 92 % Fetales Kälberserum	PAN-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
- 8 % DMSO	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ethanol 70 % (vergällt)	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU (München, Deutschland)
Fetales Kälberserum: Fetal bovine serum Permium	PAN-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Filme: CEA RP NEW	Agfa HealthCare (Mortsel, Belgien)
Filterpapier: Grade GB003 Blotting Paper	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Gel Kassetten: Empty Gel Cassettes, mini, 1.0 mm	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
G-NET:	vor Ort hergestellt
- 450 ml Aqua dest.	
- 50 ml 10x NET	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU (München, Deutschland)
- 1,25 g Gelatine	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Isopropanol	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Laufpuffer:	vor Ort hergestellt
- 4,5 l Reinstwasser	
- 500 ml Elektrophorese-Puffer 10x Konz.	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU (München, Deutschland)
Methanol	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)

3 Materialien und Methoden

Milch 5 %:	vor Ort hergestellt
- 100 ml TBST	vor Ort hergestellt
- 5 g Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Lysispuffer für PI-Färbung:	vor Ort hergestellt
- 500 ml Aqua dest.	
- 10 ml Propidium Iodide Staining Solution (1 mg/ml)	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
- 500 µl Triton X-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- 500 mg Natriumcitrat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- HCl zur Titration auf pH 8,0	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Protein-Lysis-Puffer 2x SDS:	vor Ort hergestellt
- 40 ml 10 % SDS	vor Ort hergestellt
- 23,33 ml Aqua dest.	
- 20 ml Glycerol	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
- 10 ml Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- 6,67 ml 1,5 M TRIS pH 6,8	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU (München, Deutschland)
Proteinmarker:	
peqGOLD Protein-Marker V	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
PVDF-Membranen:	
Amersham Hybond P 0.45 PVDF	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
RNase (100 µg/ml):	vor Ort hergestellt
- 19,9 ml Aqua dest.	
- 100 µl RNase A (20 mg/ml)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Sammelgel:	vor Ort hergestellt
- 2,175 ml Aqua dest.	
- 500 µl 30 % Acrylamid Mix	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- 250 µl 1,5 M TRIS pH 6,8	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU (München, Deutschland)
- 30 µl 10 % SDS	vor Ort hergestellt
- 30 µl 10 % APS	vor Ort hergestellt
- 3 µl TEMED	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
SDS 10 %:	vor Ort hergestellt
- 100 ml Aqua dest.	
- 10 g Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Solution A für ECL-Lösung:	vor Ort hergestellt
- 373,3 ml Aqua dest.	
- 26,67 ml 1,5 M TRIS pH 8,6	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU (München, Deutschland)
- 100 mg Luminol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Solution B für ECL-Lösung:	vor Ort hergestellt
- 40 ml DMSO	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- 44 mg para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

3 Materialien und Methoden

TBST:	vor Ort hergestellt
- 900 ml Aqua dest.	
- 100 ml 10x TBS	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU (München, Deutschland)
- 1 ml Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Transferpuffer:	
Gel-Transfer-Puffer Tris 250 mM	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU (München, Deutschland)
Trenngel 8 %:	vor Ort hergestellt
- 4,6 ml Aqua dest.	
- 2,7 ml 30 % Acrylamid Mix	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- 2,5 ml 1,5 M TRIS pH 8,8	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU (München, Deutschland)
- 100 µl 10 % SDS	vor Ort hergestellt
- 100 µl 10 % APS	vor Ort hergestellt
- 6 µl TEMED	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trenngel 10 %:	vor Ort hergestellt
- 4,0 ml Aqua dest.	
- 3,3 ml 30 % Acrylamid Mix	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- 2,5 ml 1,5 M TRIS pH 8,8	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU (München, Deutschland)
- 100 µl 10 % SDS	vor Ort hergestellt
- 100 µl 10 % APS	vor Ort hergestellt
- 4 µl TEMED	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trenngel 12 %:	vor Ort hergestellt
- 4,0 ml 30 % Acrylamid Mix	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- 3,3 ml Aqua dest.	
- 2,5 ml 1,5 M TRIS pH 8,8	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU (München, Deutschland)
- 100 µl 10 % SDS	vor Ort hergestellt
- 100 µl 10 % APS	vor Ort hergestellt
- 4 µl TEMED	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
WST-Reagenz:	
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Zellkulturflaschen	SARSTEDT (Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland)
Zellkultur-Medium:	
RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAN-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Zellkulturplatten	SARSTEDT (Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland)

3 Materialien und Methoden

3.5 Geräte

Begasungsbrutschränke:	
CB 210 – CO ₂ -Brutschrank	BINDER (Tuttlingen, Deutschland)
MCO-15AC – CO ₂ -Inkubator	SANYO (Moriguchi, Japan)
Durchflusszytometer:	
BD FACSCalibur	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
ELISA-Reader:	
Sunrise	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Gefrierbehälter:	
Nalgene Mr. Frosty Cryo 1 °C Freezing Container – 1.0 to 2.0 mL	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Gelelektrophorese-Kammern:	
XCell SureLock Mini-Cell	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Gelelektrophorese-Kammern- Stromversorgungsgeräte:	
PowerPac 200	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
PowerPac 3000	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine:	
Optimax (Typon)	Protec (Oberstenfeld, Deutschland)
Sicherheitswerkbänke:	
Laminar Flow-Modelle	BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland)
Western Blot-Transferkammer:	
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Zell Analyser:	
Vi-Cell AS	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
Vi-Cell XR	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
Zentrifugen:	
Centrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Rotanta 46RC	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

3.6 Software

IC ₅₀ -Berechnung:	
CompuSyn 1.0	ComboSyn (Paramus, NJ, USA)
Erfassung durchflusszytometrischer Daten:	
CellQuest Pro 5.2.1	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
Literaturverwaltung:	
EndNote X7.5	Thomson Reuters (New York, NY, USA)

3 Materialien und Methoden

Auswertung durchflusszytometrischer
Daten:

FlowJo 7.6.5

FlowJo (Ashland, OR, USA)

Bildbetrachtung und -bearbeitung:

IrfanView 4.37

Irfan Skiljan

GIMP 2.8

Spencer Kimball, Peter Mattis und das
GIMP-Entwicklerteam

Erfassung von ELISA-Reader-Daten:

Magellan 6.4

Tecan (Männedorf, Schweiz)

Textverarbeitung und

Tabellenkalkulation:

Office 2010

Microsoft (Redmond, WA, USA)

Office 2013

Microsoft (Redmond, WA, USA)

Office 2016

Microsoft (Redmond, WA, USA)

Erstellung von PDF-Dokumenten:

PDF24 Creator 9.0.2

geek Software GmbH (Berlin, Deutschland)

3.7 Zellkulturarbeiten

3.7.1 Bedingungen der Zellkultur

Die Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen oder -platten in einer Umgebung von 37 °C, 5 % CO₂ sowie 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in Brutschränken kultiviert. Das verwendete Medium bestand zu 90 % aus RPMI 1640 mit L-Glutamin und zu 10 % aus fetalem Kälberserum.

3.7.2 Einfrieren von Zelllinien

Um zeitweise nicht benötigte Zelllinien längerfristig aufzubewahren, wurden diese bei einer Temperatur von –80 °C zwischengelagert. Hierzu wurde das Medium von den einzufrierenden Zellen bei 300 g und 4 °C 10 Minuten lang abzentrifugiert und verworfen. Daraufhin wurde pro $10 \cdot 10^6$ Zellen 1 ml eisgekühltes Einfriermedium hinzugegeben und die Zellpellets darin gelöst. Anschließend wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension in ein Cryo Tube überführt und in einem Gefrierbehälter um 1 °C pro Minute bis auf –80 °C gekühlt.

3.7.3 Auftauen von Zelllinien

Zum Auftauen der bei –80 °C gelagerten Zelllinien wurde ein entsprechendes Cryo Tube im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und daraufhin die Zellsuspension in 10 ml 37 °C warmes Medium, bestehend zu 80 % aus RPMI 1640 mit L-Glutamin und zu 20 % aus fetalem Kälberserum, überführt. Danach wurde das Medium bei 300 g 10 Minuten lang abzentrifugiert, verworfen und die Zellpellets in weiteren 10 ml des zuvor beschriebenen Mediums gelöst und anschließend in Zellkulturflaschen kultiviert. Während der darauffolgenden Woche wurde auch beim Splitten der Zelllinien Medium verwendet, welches zu 20 % fetales Kälberserum enthielt.

3.7.4 Splitten von Zelllinien

Die Zelllinien wurden außerhalb der Versuche alle 2 – 3 Tage mit frischem Medium auf Richtkonzentrationen gesplittet und mit einem Mediumvolumen von ca. 10 ml weiterkultiviert.

3.8 Automatische Zellkonzentrations- und Zellviabilitätsbestimmung

(Vi-Cell™)

Vi-Cell™ ist die Bezeichnung eines Zellanalysegeräts zur automatischen Zellkonzentrations- und Zellviabilitätsbestimmung. Der Mechanismus beruht dabei auf dem Trypanblau-Ausschlusstest. Werden Zellen in einer Trypanblau-Lösung inkubiert, so nehmen nur bereits tote Zellen den Farbstoff ins Zellinnere auf und färben sich somit dunkler an als lebende Zellen. Das Gerät nimmt pro Probe eine Zellsuspension mit einem Volumen zwischen 0,5 und 2 ml auf, mischt diese mit einer Trypanblau-Lösung und pumpt die gemischte Suspension in eine Durchflusszelle, in welcher 100 Bilder digital aufgenommen und in eine Pixelmatrix umgewandelt werden. Jedem Element auf dieser Matrix wird einer von 256 Grauwerten zugeordnet. Anhand der ermittelten Grauwerte kann eine Software mit Hilfe eines Algorithmus lebende (helle) von toten (dunklen) Zellen unterscheiden und somit sowohl die Zellkonzentration als auch die Zellviabilität bestimmen. Die Ergebnisse werden anschließend automatisch gespeichert und das Gerät automatisch gereinigt.

3.9 Metabolische Aktivität (WST-1-Assay)

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellansätzen wurde ein WST-1-Assay-Reagenz benutzt, welches aus dem Tetrazoliumsalz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) und einem Elektronenkopplungsreagenz, gelöst in phosphatgepufferter Salzlösung, besteht. Das Prinzip der Messmethode besteht darin, dass das schwach rote Tetrazoliumsalz durch ein mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System in metabolisch aktiven Zellen in dunkelrotes Formazan gespalten wird. Eine größere Menge an entstehendem Formazan korreliert somit direkt mit einer größeren Anzahl an metabolisch aktiven Zellen in einer Probe. Der beschriebene Farbumschlag kann durch ein Spektralphotometer (ELISA-Reader) quantifiziert werden. Hierbei ist eine Wellenlänge zur Messung der Absorption des Formazan-Produkts bei 420 bis 480 nm (Absorptionsmaximum bei ca. 440 nm) sowie eine Referenzwellenlänge von über 600 nm zu wählen. Zu beachten ist, dass durch das Massenwirkungsgesetz eine geringe Menge Formazan auch ohne die Anwesenheit metabolisch aktiver Zellen entsteht. Deswegen wurde bei jedem Versuch eine Leerprobe, bestehend nur aus Zellmedium und WST-1-Reagenz, angelegt und der Messwert der Leerprobe von den Messwerten der Zellproben subtrahiert.

3 Materialien und Methoden

Bei den durchgeführten Versuchen wurden 96-Well-Zellkulturplatten und eine Probengröße von 100 µl Zellsuspension verwendet. Jeder Probe wurden 10 µl WST-1-Reagenz hinzugefügt und die Zellkulturplatten daraufhin für 3 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ sowie 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend im ELISA-Reader ausgelesen. Wegen der Lichtempfindlichkeit des WST-1-Reagenzes wurden die Arbeiten mit diesem in abgedunkelter Umgebung durchgeführt.

3.10 Apoptose (PE Annexin V- und 7-AAD-Färbung)

Der Vorteil der Bestimmung apoptotischer Zellen mit Hilfe einer Annexin V- und 7-AAD-Doppelfärbung besteht darin, dass zwischen lebenden, frühapoptotischen und spätapoptotischen Zellen unterschieden werden kann. Das hierzu verwendete Kit besteht aus 10X Annexin V Binding Buffer, 7-AAD und PE Annexin V, jeweils gelöst in wässriger Pufferlösung.

Bereits im frühapoptotischen Stadium verliert die Plasmamembran einer Zelle ihre Asymmetrie. Phosphatidylserin, welches sich normalerweise an der Innenseite der Zellmembran befindet, wird dann auch auf deren Außenseite exponiert. Bei Annexin V handelt es sich um ein Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin. Annexin V kann auch, wie im verwendeten Kit der Fall, in an Phycoerythrin gebundener Form eingesetzt werden. Per Durchflusszytometer ist es dann möglich, mit diesem Fluorochrom markierte Zellen zu identifizieren.

Bei spätapoptotischen Zellen wird schließlich die Zellmembran permeabel für Stoffe wie den Vitalitätsfarbstoff 7-AAD. Somit sind diese Zellen ebenfalls per Durchflusszytometrie identifizierbar.

Daraus ergeben sich die Kombinationen PE Annexin V negativ und 7-AAD negativ für nicht-apoptotische Zellen, PE Annexin V positiv und 7-AAD negativ für frühapoptotische Zellen sowie PE Annexin V positiv und 7-AAD positiv für spätapoptotische Zellen.

Der im Kit enthaltene 10X Annexin V Binding Buffer wurde im für den Versuch benötigten Umfang im Verhältnis 10 % Puffer und 90 % destilliertes Wasser verdünnt. Für jede Probe wurde eine Zellsuspension mit 10⁶ Zellen verwendet, deren Medium bei 1500 RPM und 4 °C 5 Minuten lang abzentrifugiert und dann verworfen wurde. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit je 1,5 ml gekühltem DPBS, welches ebenfalls jeweils bei 1500 RPM und 4 °C 5 Minuten lang abzentrifugiert und dann verworfen wurde. Jeder Zellprobe wurden daraufhin 100 µl des verdünnten

3 Materialien und Methoden

Puffers und anschließend je 5 µl PE Annexin V und 7-AAD hinzugegeben. Die so behandelten Proben wurden für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert, woraufhin weitere 400 µl des verdünnten Puffers hinzugefügt wurden. Schließlich erfolgte die Detektion per Durchflusszytometer.

3.11 Zellzyklusanalyse (PI-Färbung)

Das Prinzip der Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid-Färbung beruht auf der Tatsache, dass PI ein fluoreszierender und somit per Durchflusszytometrie detektierbarer Farbstoff ist, welcher DNA anfärbt. Die bei einer Zelle gemessene Fluoreszenzintensität korreliert mit der in der Zelle enthaltenen Menge DNA. Trägt man die Anzahl der so markierten Zellen zu ihrer jeweiligen Fluoreszenzintensität auf, lässt sich ein erstes Maximum bei einem DNA-Gehalt ausmachen, welcher dem Zustand der G₀- bzw. G₁-Phase entspricht (einfacher Chromosomensatz). Ein zweites Maximum bei doppelter Intensität veranschaulicht solche Zellen, die sich in der G₂- bzw. M-Phase befinden (doppelter Chromosomensatz). Zellen in der S-Phase erzeugen je nach aktuellem DNA-Gehalt ein Signal im Bereich zwischen diesen Maxima. Per Software lässt sich die prozentuale Verteilung der beschriebenen Fraktionen ermitteln.

Zur Erstellung der Proben wurde jeweils eine Zellsuspension mit 10⁶ Zellen verwendet, deren Medium bei 2000 RPM und 4 °C 5 Minuten lang abzentrifugiert und dann verworfen wurde. Daraufhin wurden die Zellen mit je 1,5 ml gekühltem DPBS gewaschen, welches im Anschluss ebenfalls bei 2000 RPM und 4 °C 5 Minuten lang abzentrifugiert und dann verworfen wurde. Anschließend erfolgte eine Durchmischung der Proben mit jeweils 1 ml eisgekühltem 70 %igem Ethanol und daraufhin eine 30 Minuten dauernde Inkubation auf Eis. Hiernach wurden die Proben erneut, wie vorstehend beschrieben, zweimal gewaschen und schließlich zunächst je 50 µl RNase (100 µg/ml) gefolgt von je 200 µl Lysispuffer für PI-Färbung hinzugegeben. Im Anschluss erfolgte die Analyse per Durchflusszytometer.

3.12 Proteinexpression (Western Blot)

Das Western Blot-Verfahren ermöglicht die spezifische und semiquantitative Detektion einzelner Proteine aus Zellproben. Zu Beginn erfolgt die Herstellung von Proteinproben, deren Volumen sich proportional nach der zur Herstellung verwendeten

3 Materialien und Methoden

Zellzahl richtet. Durch eine Gelelektrophorese werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt und anschließend das Western Blot-Verfahren angewandt. Hierbei werden die Proteine zunächst auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen und mit primären Antikörpern, welche spezifisch an bestimmte Proteine binden, markiert. Durch Zugabe sekundärer Antikörper, welche sowohl an primäre Antikörper binden als auch an Enzyme gekoppelt sind, lassen sich mittels einer Chemolumineszenzreaktion die Proteine darstellen.

Für jede Probe wurden 2 ml einer Zellsuspension mit bekannter Zellkonzentration verwendet, auf Eis gelagert und das Probenmedium bei 3200 RPM 11 Minuten lang abzentrifugiert und dann verworfen. Anschließend wurde den Pellets, auch auf Eis gelagert, pro 10^6 Zellen 90 μ l Protein-Lysis-Puffer 2x SDS hinzugefügt und die Suspension über Nacht bei 4 °C durchmischt. Daraufhin wurde den Proben pro 10^6 Zellen 10 μ l gesättigte Bromphenolblau-Lösung zugegeben. Hiernach erfolgte eine 15 Minuten dauernde Erhitzung bei 95 °C gefolgt von einer erneuten Durchmischung und anschließenden Lagerung auf Eis. Die Gele wurden pro Tasche mit 10 μ l Probensuspension bzw. eine Tasche mit 10 μ l Proteinmarker geladen. Die Betriebsspannung der Gelelektrophorese-Kammern wurde für 30 Minuten bei 61 V, für weitere 90 Minuten bei 81 V und schließlich, bis die Bromphenolblau-Bande beinahe das untere Ende des Gels erreicht hat, bei 121 V gehalten. In einer Western Blot-Transferkammer wurden die Gele 2,5 Stunden lang bei 250 mA auf PVDF-Membranen übertragen. Anschließend wurden die Membranen für eine Stunde mit 5 %iger Milch geblockt und daraufhin dreimal 10 Minuten lang mit TBST gewaschen. Primäre Antikörper wurden in vorgegebener Konzentration in 5 %igem Albumin Fraktion V bzw. in G-NET verdünnt und die Membranen mit 2 ml der jeweiligen Verdünnung über Nacht bei 4 °C rollend inkubiert. Nach dem darauffolgenden Entfernen der Verdünnung der ersten Antikörper wurden die Membranen erneut dreimal 10 Minuten lang mit TBST gewaschen bevor jeweils 5 ml der in vorgegebener Konzentration in 5 %iger Milch verdünnten sekundären Antikörper hinzugegeben wurden. Es folgte eine 60 Minuten dauernde Inkubation bei Raumtemperatur, wonach auch die zweite Verdünnung entfernt wurde und die Membranen anschließend erneut dreimal 10 Minuten lang mit TBST gewaschen wurden. Schließlich wurden die Membranen mit je 3 ml ECL-Lösung bedeckt und 2 Minuten lang inkubiert. Zur Detektion der Chemolumineszenzreaktion wurden mit den Membranen in einer Dunkelkammer Filme belichtet und anschließend entwickelt.

3.13 Berechnung der Fraction of Product

Mit Hilfe der Fraction of Product-Werte kann nach Webb berechnet werden, ob sich durch die Kombination zweier Inhibitoren synergistische, additive oder antagonistische Effekte einstellen. (Webb, 1963) Zunächst wird dazu die Fraction Affected (FA) (relative Verminderung viabler Zellen im Vergleich einer behandelten Probe zur unbehandelten Kontrollprobe) der zu untersuchenden Inhibitoren in Monotherapie, wie auch in Kombinationstherapie bestimmt. Die Berechnung der Fraction of Product-Werte erfolgt daraufhin folgendermaßen:

$$[(1 - \text{FA Inhibitor A}) \cdot (1 - \text{FA Inhibitor B})] - (1 - \text{FA Inhibitoren A und B})$$

Als Folge eines synergistischen Effekts werden Werte größer als 0,1 gewertet, als Folge eines antagonistischen Effekts Werte kleiner als -0,1 und als Folge eines additiven Effekts Werte zwischen diesen Grenzen.

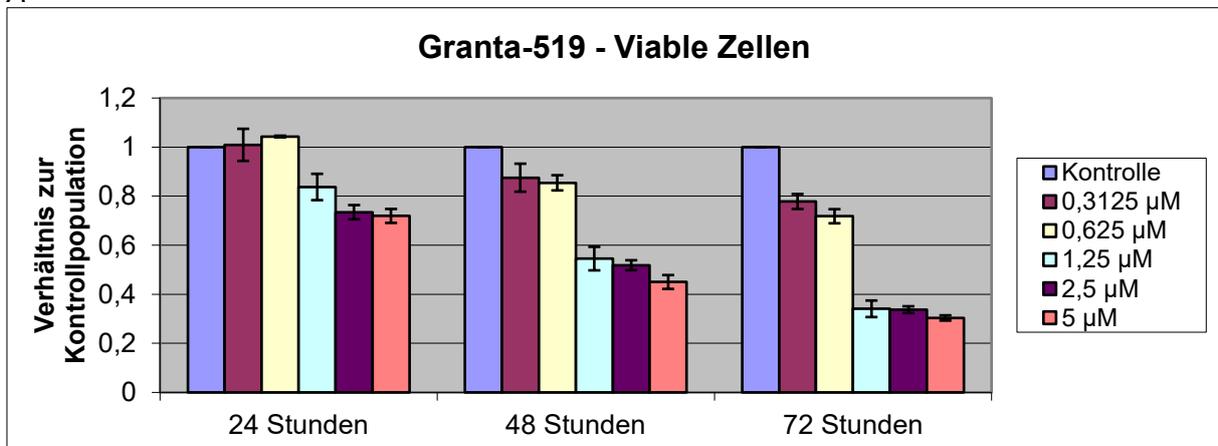
4 Ergebnisse

4.1 Wirkung von Copanlisib

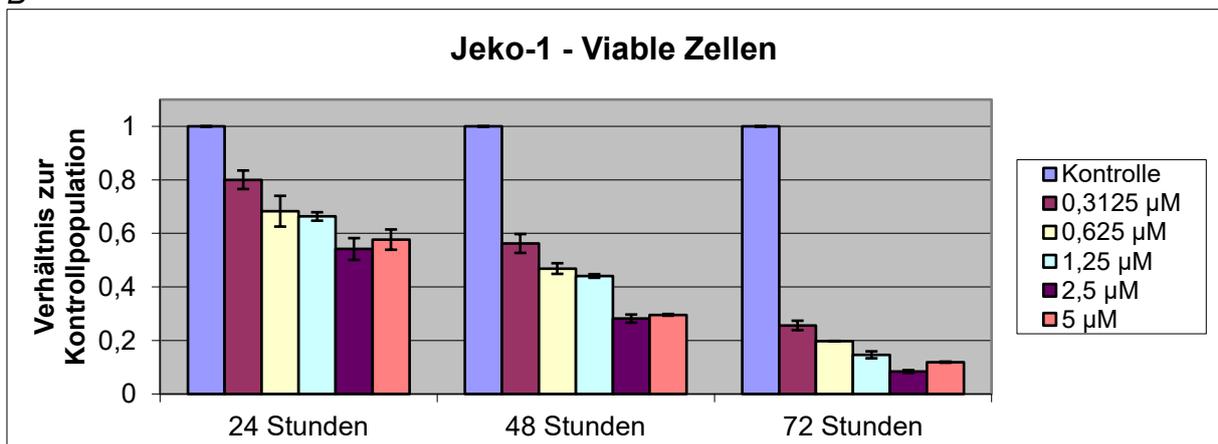
Um die Wirkstärke von Copanlisib bei Mantelzelllymphomzelllinien einordnen zu können, wurden anfangs sechs Zelllinien mit 0 μM , 0,3125 μM , 0,625 μM , 1,25 μM , 2,5 μM sowie 5 μM Copanlisib für eine Zeitdauer von 24 Stunden, 48 Stunden sowie 72 Stunden behandelt. Aus den per Vi-Cell™ ermittelten Werten der Zellkonzentrationen und -viabilitäten wurden anschließend die Verhältnisse von viablen Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollpopulation und im Vergleich zum Ansatzzeitpunkt der gleich behandelten Population grafisch ausgewertet (Abb. 7 A–F). Die Mittelwerte der ausgewerteten Verhältnisse von viablen Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollpopulation, jeweils nach 72 Stunden, wurden zudem herangezogen, um per CompuSyn die entsprechenden mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50} -Werte) zu berechnen (Kap. 4.1.2).

4.1.1 Wirkstärke zu verschiedenen Zeitpunkten

A

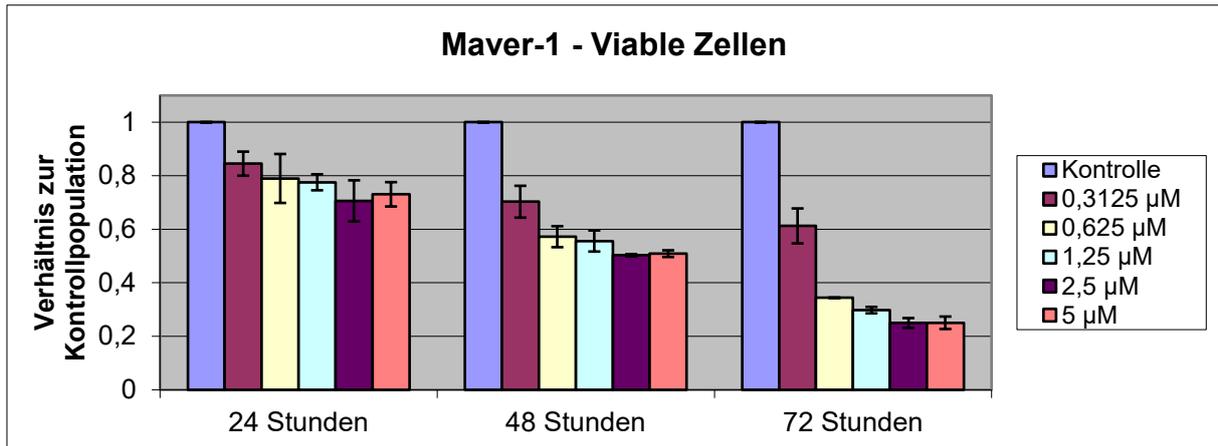


B

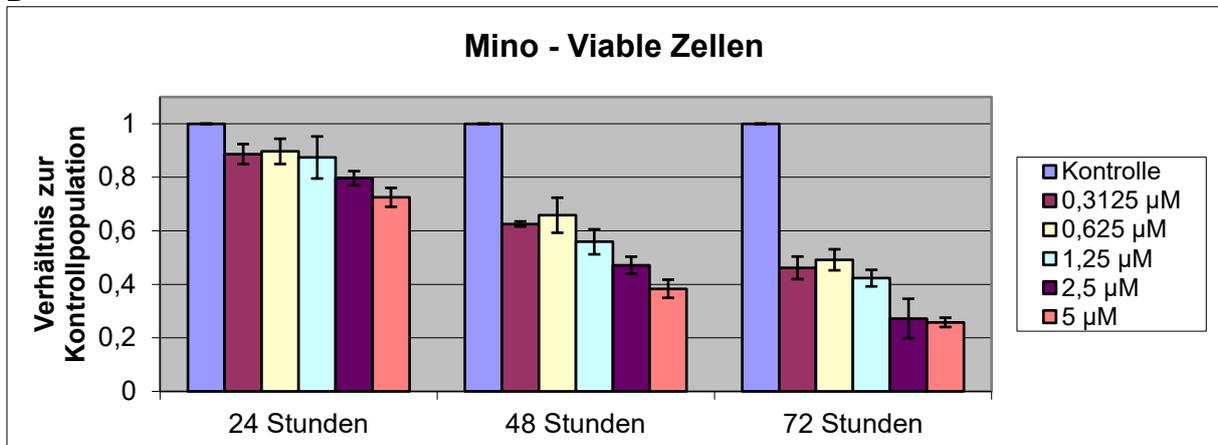


4 Ergebnisse

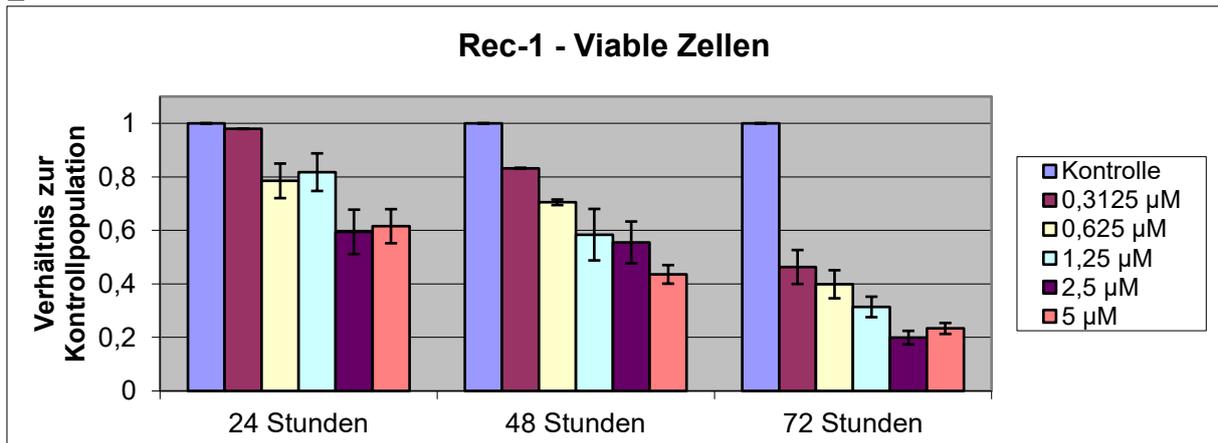
C



D



E



4 Ergebnisse

F

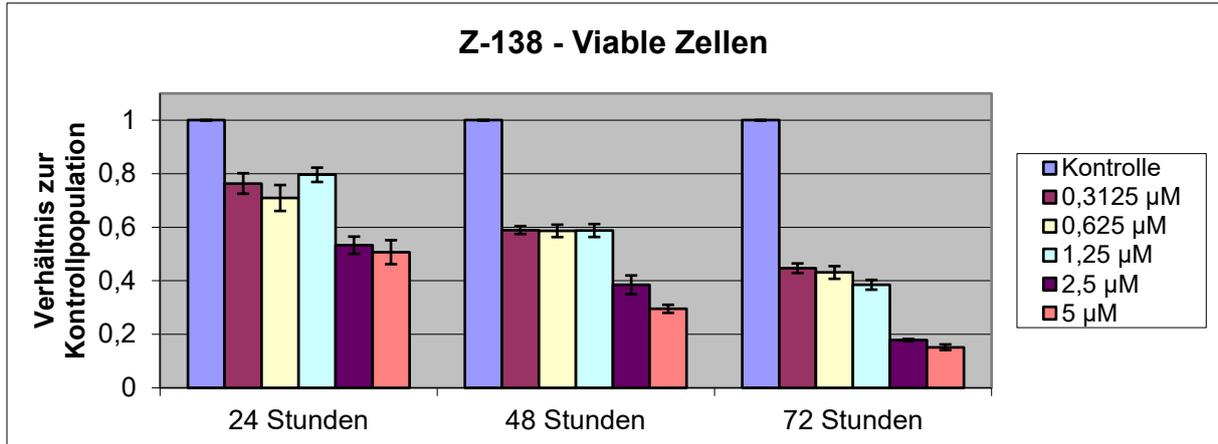
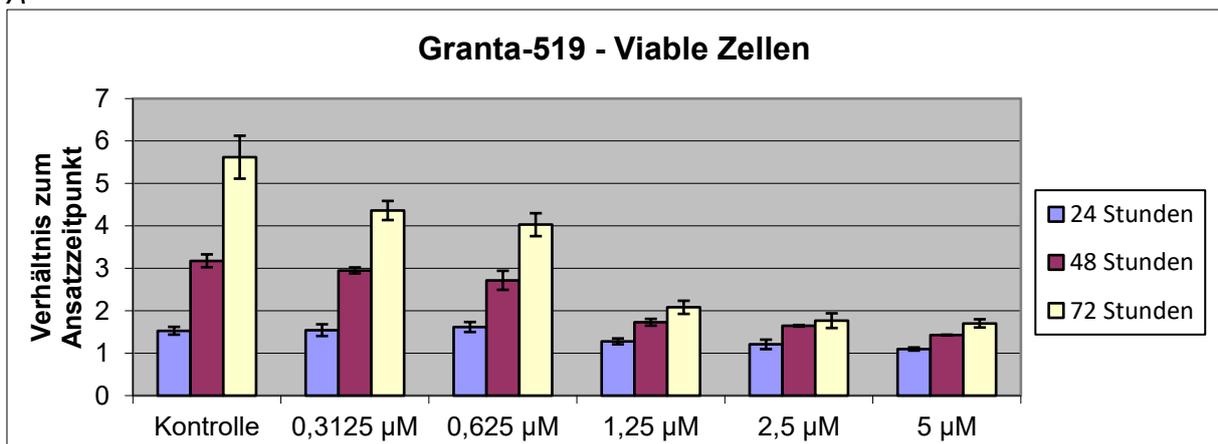


Abbildung 7 A–F: Verhältnis der viablen Zellen zur unbehandelten Kontrollpopulation nach Behandlung mit Copanlisib. Die Daten entstammen drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

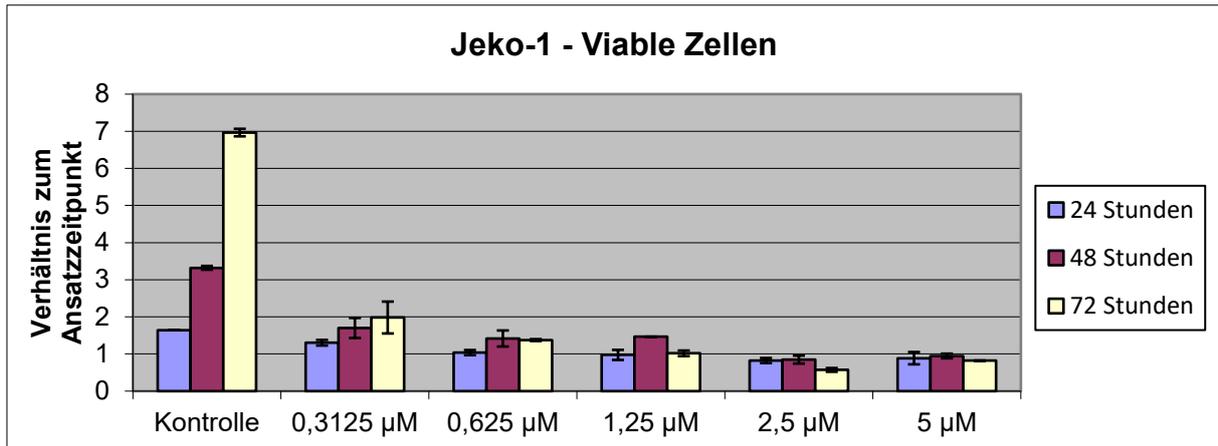
Die Ergebnisse zeigen ein ausgeprägtes Ansprechen aller getesteten Zelllinien auf den Inhibitor Copanlisib (Abb. 7 A–F). Deutliche Unterschiede sind jedoch in der Wirkstärke zu erkennen. Für eine vergleichende Einordnung sind in Kapitel 4.1.2 die IC_{50} -Werte aufgeführt. Jeko-1 ist als empfindlichste Zelllinie auszumachen, bei der eine Inhibitorkonzentration von 0,3125 µM eine deutliche Wachstumsreduktion der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ergibt (Abb. 7 B). Bei der resistentesten Zelllinie, Granta-519, ist ab einem Zeitpunkt von 48 Stunden zwar auch bei einer Copanlisib-Konzentration von 0,3125 µM eine Wirkung zu beobachten, welche über die Standardabweichung der Messwerte hinausgeht, jedoch tritt ein deutliches Ansprechen auf den Inhibitor erst ab einer Konzentration von 1,25 µM auf (Abb. 7 A). Bei einer Erhöhung der Inhibitorkonzentration von 2,5 µM auf 5 µM ist bei allen getesteten Zelllinien keine deutliche Steigerung der Wachstumshemmung mehr zu erkennen (Abb. 7 A–F).

A

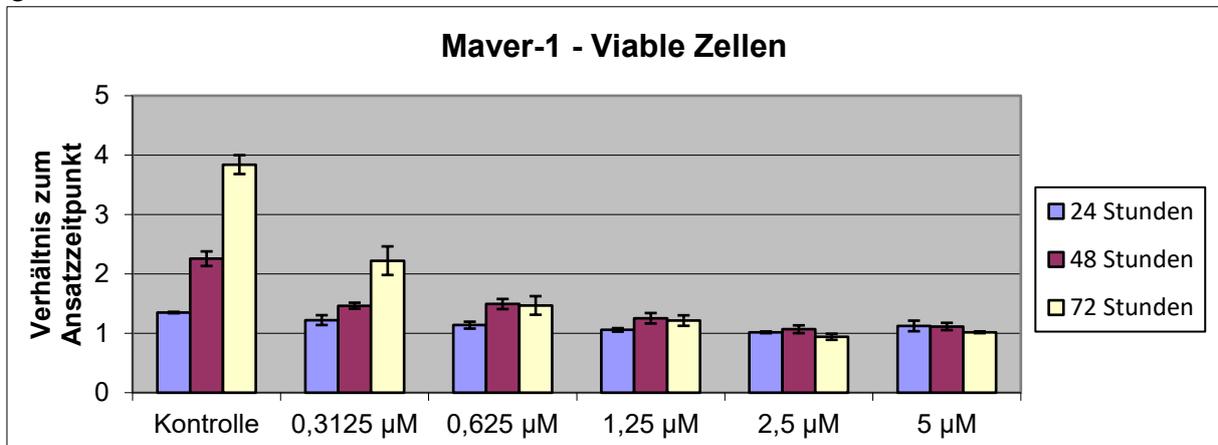


4 Ergebnisse

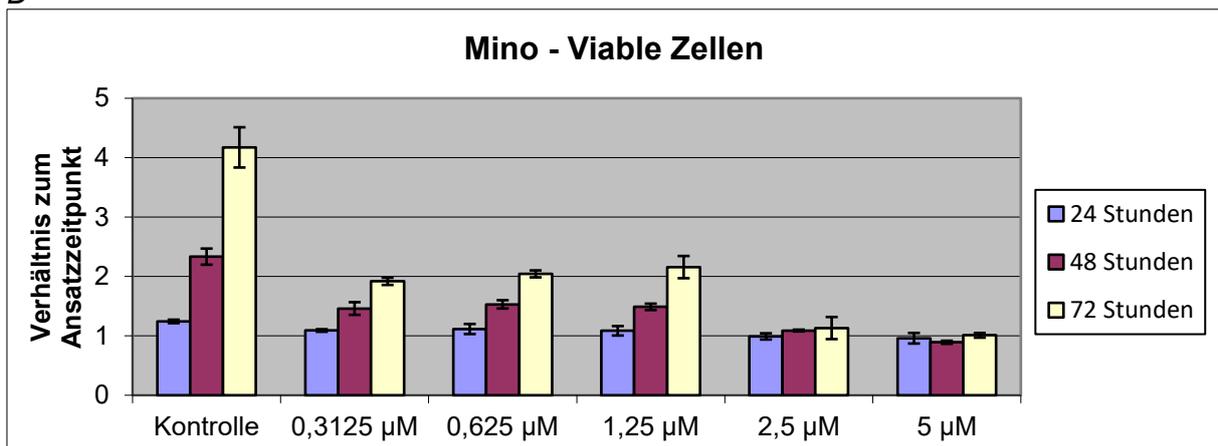
B



C

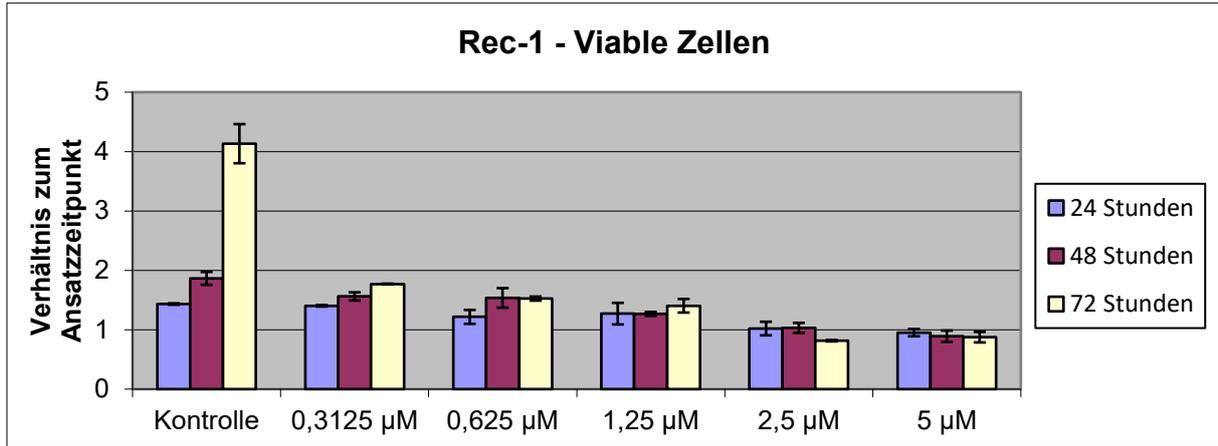


D



4 Ergebnisse

E



F

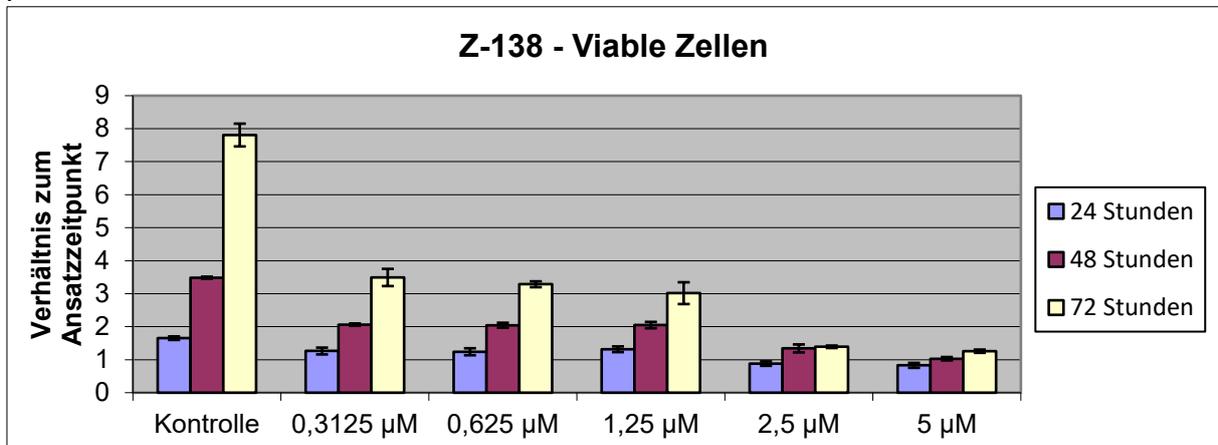


Abbildung 8 A – F: Viable Zellen im zeitlichen Verlauf nach Behandlung mit Copanlisib. Die Daten entstammen drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

Betrachtet man die Zellzahlen im Vergleich zum Ansatzzeitpunkt, so fällt auf, dass der Zellzuwachs in allen Zelllinien durch Copanlisib deutlich gehemmt wird (Abb. 8 A – F). Ein Rückgang der Zellzahlen kann jedoch nur bei Jeko-1 und Rec-1, jeweils bei einer Inhibitorkonzentration von mindestens 2,5 µM, festgestellt werden (Abb. 8 B und E). Bei der resistentesten Zelllinie, Granta-519, wird selbst mit einer Konzentration von 5 µM keine Stagnation der Zellzahl erreicht (Abb. 8 A).

4 Ergebnisse

4.1.2 IC₅₀(72 Stunden)

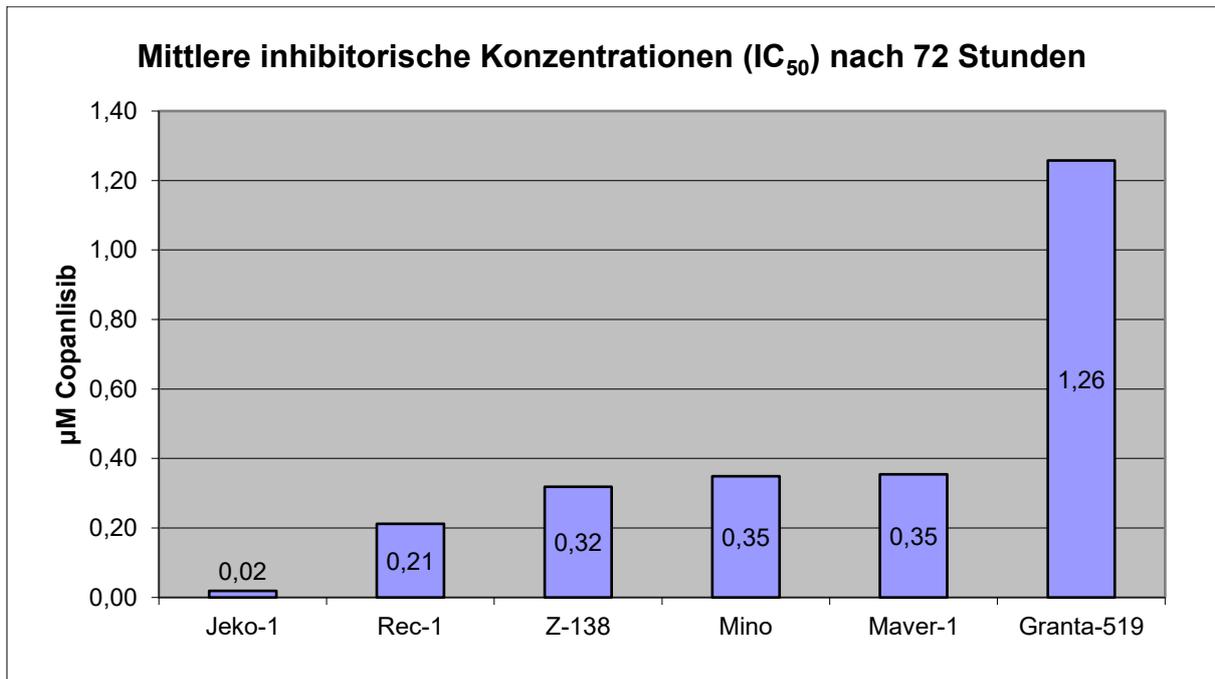


Abbildung 9: Mittlere inhibitorische Konzentrationen (IC₅₀) mit Copanlisib nach 72 Stunden. (Datentransfer aus Abbildung 7 A – F.)

Die IC₅₀-Werte der untersuchten Zelllinien bei Behandlung mit Copanlisib und Auswertung nach 72 Stunden wurden mit zwei Ausnahmen zwischen 0,2 µM und 0,4 µM bestimmt (Abb. 9). Jeko-1 zeigt mit einem Wert von 0,02 µM eine deutlich stärkere Sensitivität gegenüber dem Inhibitor, während Granta-519 mit einem Wert von 1,26 µM eine deutlich stärkere Resistenz aufweist.

4.2 Vergleich von Copanlisib und selektiven PI3K α -, β - und δ -Inhibitoren

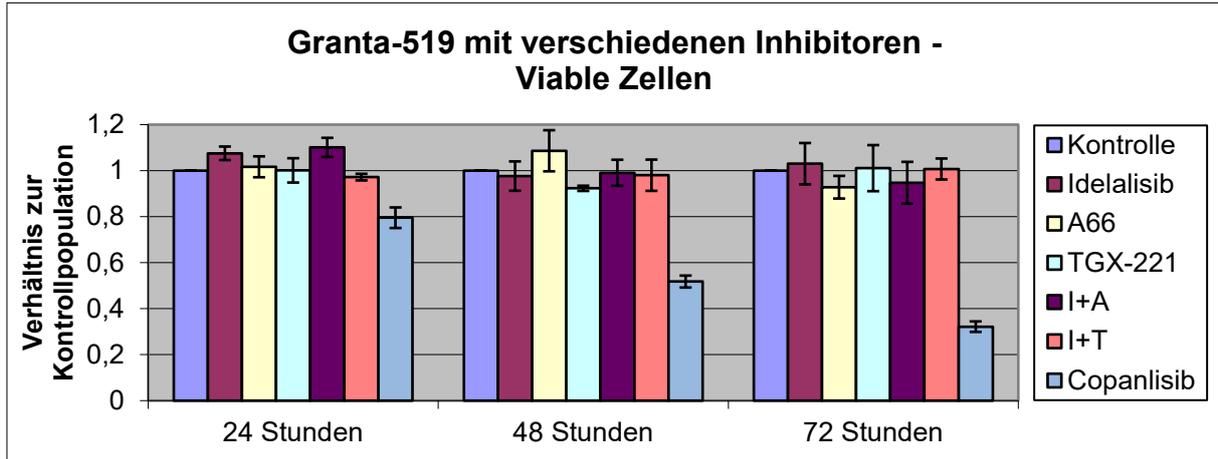
Da es sich bei Copanlisib um einen PI3K-Inhibitor handelt, welcher selektiv die Untereinheiten alpha (p110 α) und delta (p110 δ) inhibiert, wurde seine Wirksamkeit bei Mantelzelllymphomzelllinien im Vergleich zu anderen selektiven PI3K-Inhibitoren untersucht. Hierbei kamen der selektive alpha-Inhibitor A66, der selektive beta-Inhibitor TGX-221, der selektive delta-Inhibitor Idelalisib sowie Kombinationen von Idelalisib und A66 wie auch Idelalisib und TGX-221 zum Einsatz. Neben den MCL-Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Rec-1 wurden die Versuche auch mit Jurkat als Kontrollzelllinie (T-ALL) durchgeführt. Es wurde erneut per Vi-Cell™ das Verhältnis der Zahl viabler Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe wie auch zum Ansatzzeitpunkt, jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden, ermittelt (Kap. 4.2.1 und 4.2.3). Zur Beurteilung möglicher synergistischer bzw. antagonistischer Effekte bei

4 Ergebnisse

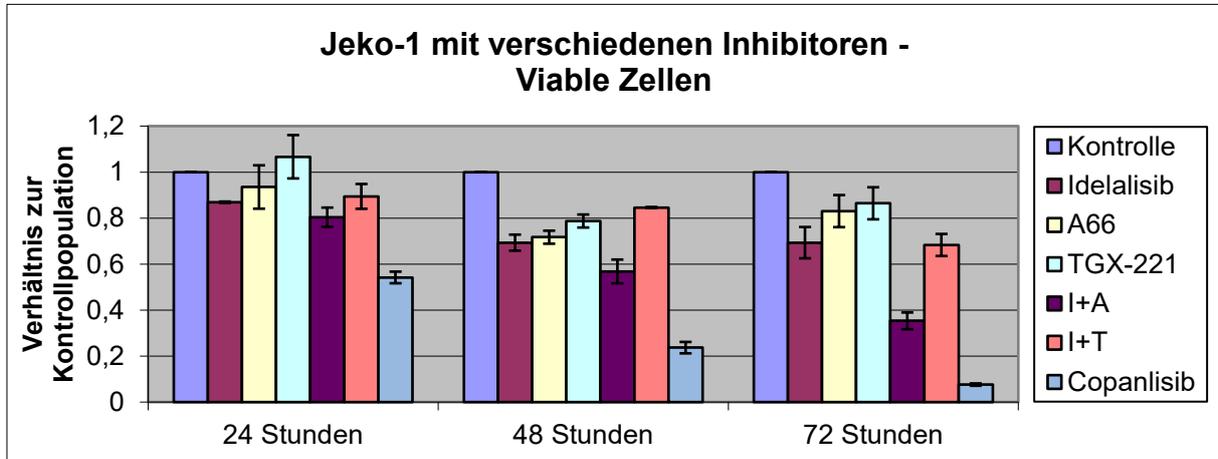
Kombinationstherapien wurden in diesen Fällen Fraction of Product-Werte nach Webb berechnet (Kap. 4.2.2). Eine weitere Analyse, welche sich auf stoffwechselaktive Zellen bezieht, wurde nach 48 und 72 Stunden mittels WST-1-Assay durchgeführt (Kap. 4.2.4). Die Inhibitorkonzentrationen betragen einheitlich 5 μM .

4.2.1 Analyse viabler Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Vi-Cell™)

A

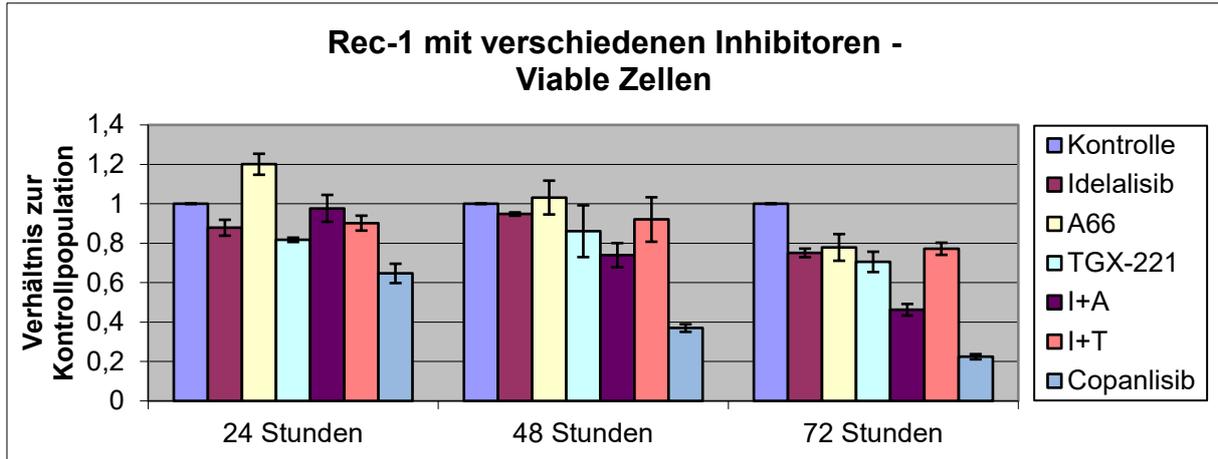


B



4 Ergebnisse

C



D

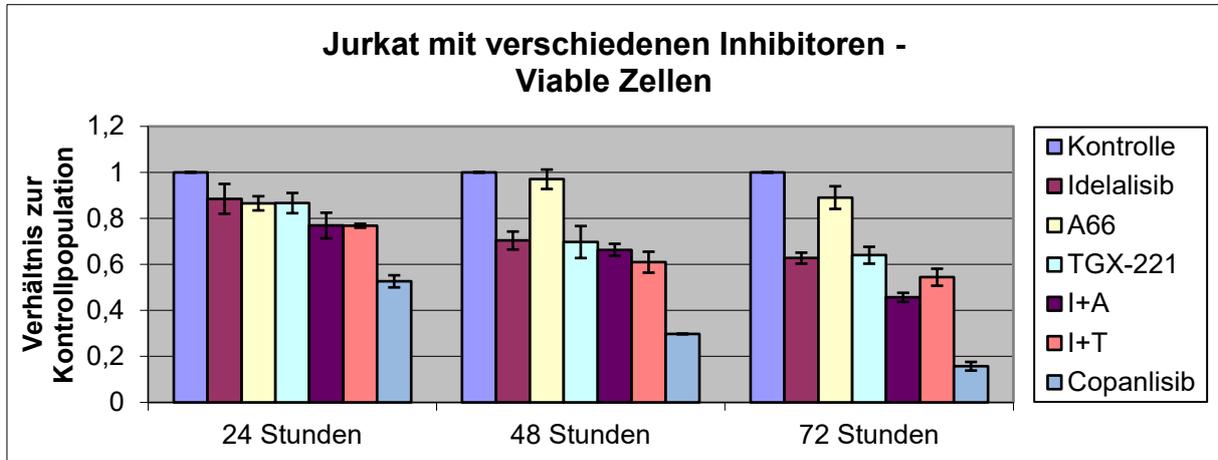


Abbildung 10 A – D: Verhältnis der viablen Zellen zur unbehandelten Kontrollpopulation mit verschiedenen PI3K-Inhibitoren (5 μ M). Die Daten entstammen drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

Copanlisib reduziert bei allen Zelllinien das Wachstum deutlich und ist dabei effektiver als die übrigen, sowohl in Mono- als auch in Kombinationstherapie getesteten, PI3K-Inhibitoren (Abb. 10 A – D). Granta-519 zeigt sich ausschließlich sensitiv für Copanlisib (Abb. 10 A). Während bei der Zelllinie Jeko-1 Idelalisib wirksamer ist als A66 und TGX-221, liegen die Wirkstärken von Idelalisib und TGX-221 bei Rec-1 und Jurkat vor A66 nahe beieinander (Abb. 10 B – D).

4 Ergebnisse

4.2.2 Errechnung der Fraction of Product

Fraction of Product-Werte der Inhibitorkombinationen

	24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden
Idelalisib + A66 (Granta-519)	-0,008	0,069	0,009
Idelalisib + TGX-221 (Granta-519)	0,104	-0,079	0,034
Idelalisib + A66 (Jeko-1)	0,009	-0,071	0,222
Idelalisib + TGX-221 (Jeko-1)	0,033	-0,301	-0,084
Idelalisib + A66 (Rec-1)	0,077	0,239	0,123
Idelalisib + TGX-221 (Rec-1)	-0,185	-0,104	-0,243
Idelalisib + A66 (Jurkat)	-0,003	0,020	0,101
Idelalisib + TGX-221 (Jurkat)	-0,002	-0,119	-0,143

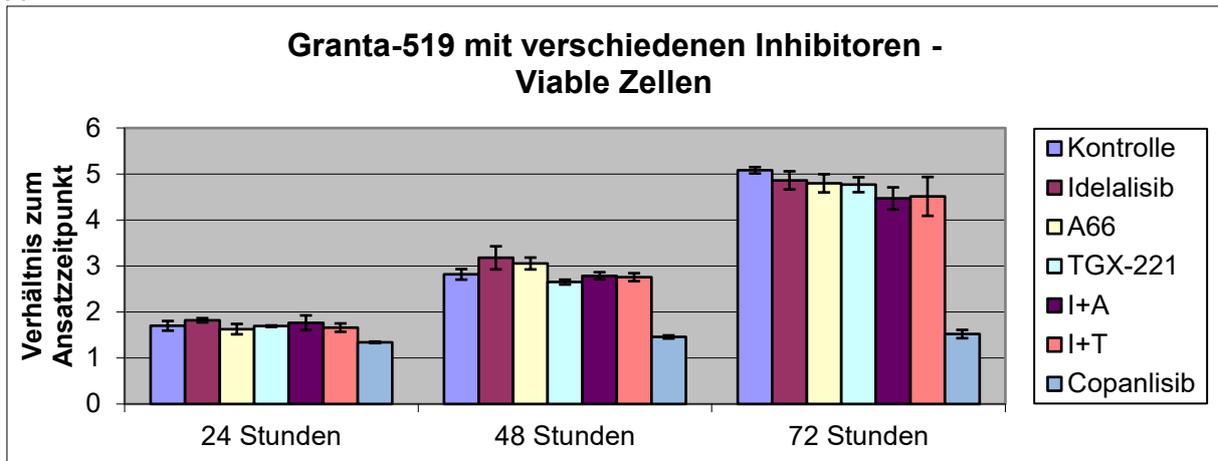
Tabelle 13: Fraction of Product-Werte der Inhibitorkombinationen aus Idelalisib + A66 sowie Idelalisib + TGX-221. Datentransfer aus Abbildung 10 A – D. Grüne Werte: Synergistischer Effekt. Schwarze Werte: Additiver Effekt. Rote Werte: Antagonistischer Effekt.

Betrachtet man die Zahl viabler Zellen bei den Zelllinien Jeko-1, Rec-1 und Jurkat nach 72 Stunden, so hemmt die Kombinationstherapie aus Idelalisib und A66 das Zellwachstum, nur übertroffen durch eine Monotherapie mit Copanlisib, am zweiteffektivsten (Abb. 10 B – D). Zu diesem Zeitpunkt ist bei diesen Zelllinien durch die Fraction of Product-Werte ein synergistischer Effekt von Idelalisib und A66 zu erkennen (Tab. 13). Bei weiterer Betrachtung der gesammelten Fraction of Product-Werte in Tabelle 13 zeigen sich für die Inhibitorkombination aus Idelalisib und A66 in insgesamt vier Fällen synergistische Werte. Für die weniger effektive Inhibitorkombination aus Idelalisib und TGX-221 können hingegen in sechs Fällen antagonistische Werte beobachtet werden.

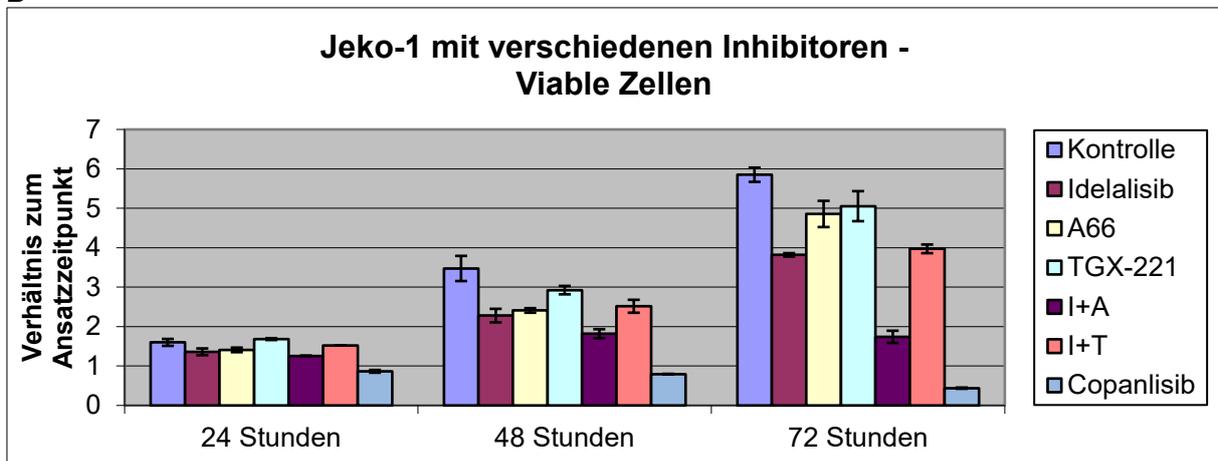
4 Ergebnisse

4.2.3 Analyse viable Zellen im zeitlichen Verlauf (Vi-Cell™)

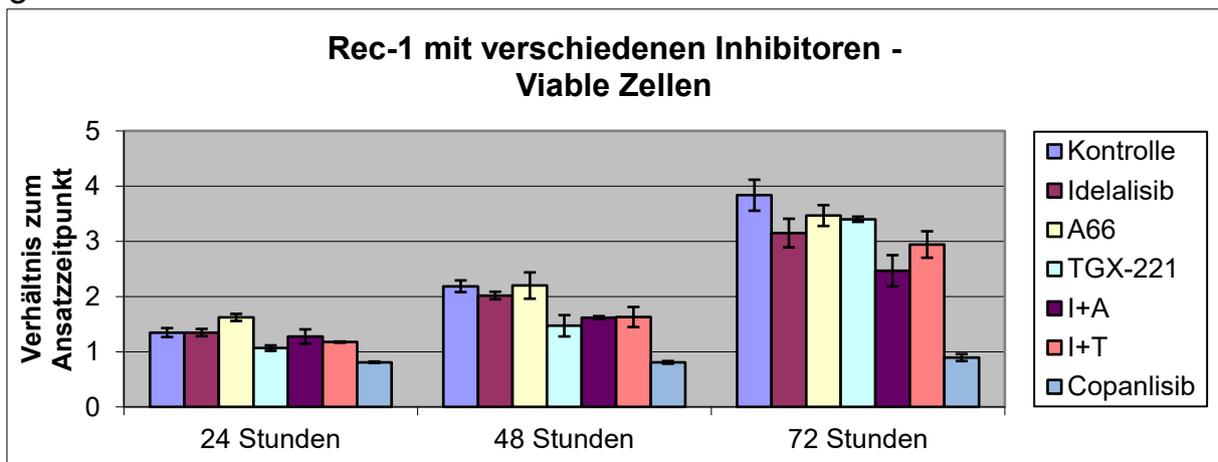
A



B



C



4 Ergebnisse

D

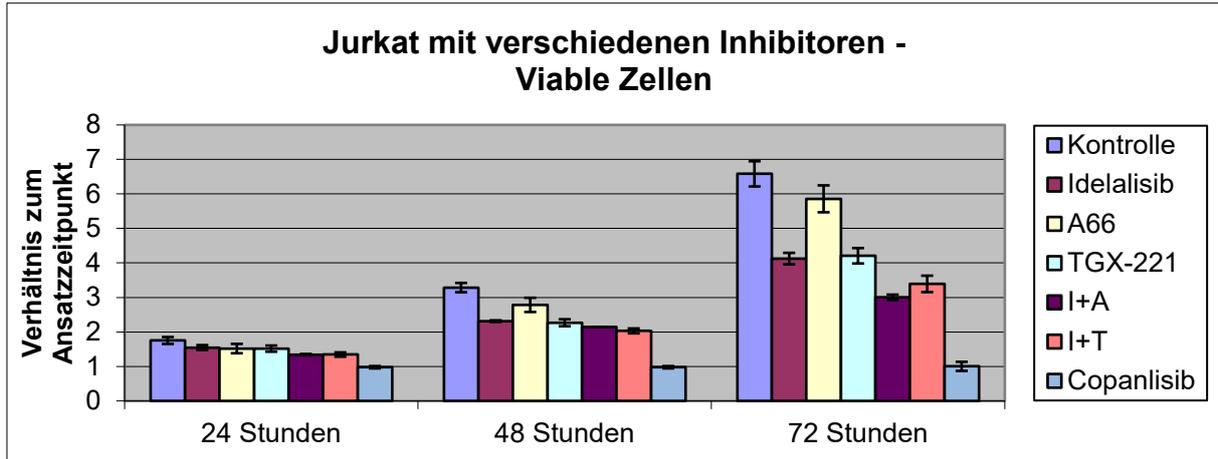
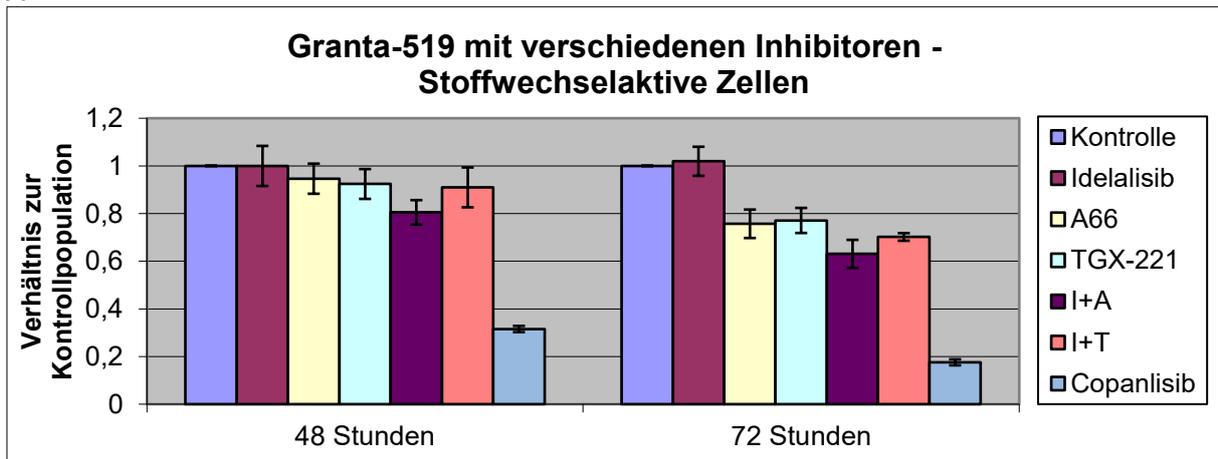


Abbildung 11 A–D: Verhältnis der viablen Zellen zum Ansatzzeitpunkt mit verschiedenen PI3K-Inhibitoren (5 μ M). Die Daten entstammen drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

Vergleicht man die Anzahl viabler Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden mit den Werten des Ansatzzeitpunkts, wird deutlich, dass einzig Copanlisib, als wirksamster Inhibitor, teilweise in der Lage ist, eine deutliche Verminderung der viablen Zellen (in Jeko-1) bzw. eine Stagnation der Zellzahl (in Rec-1 und Jurkat) zu erreichen (Abb. 11 A–D). Im Weiteren richtet sich die Einordnung der ermittelten Wirkstärken nach den bereits gezeigten Ergebnissen.

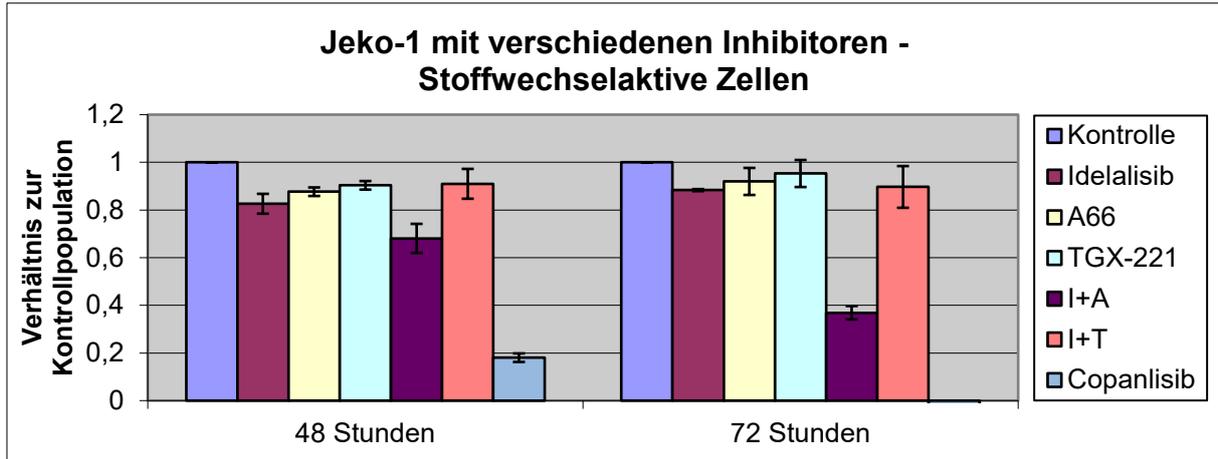
4.2.4 Analyse stoffwechselaktiver Zellen (WST-1-Assay)

A

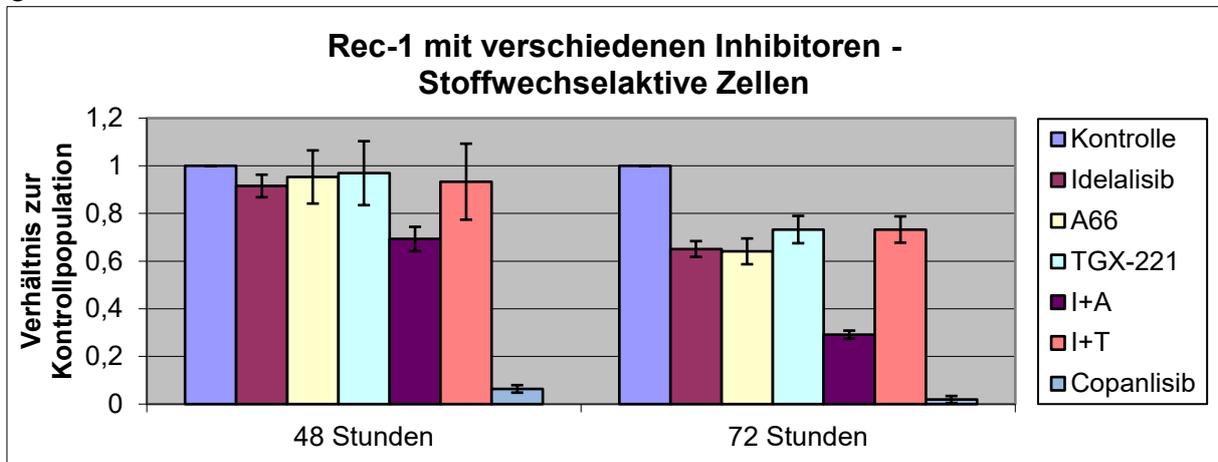


4 Ergebnisse

B



C



D

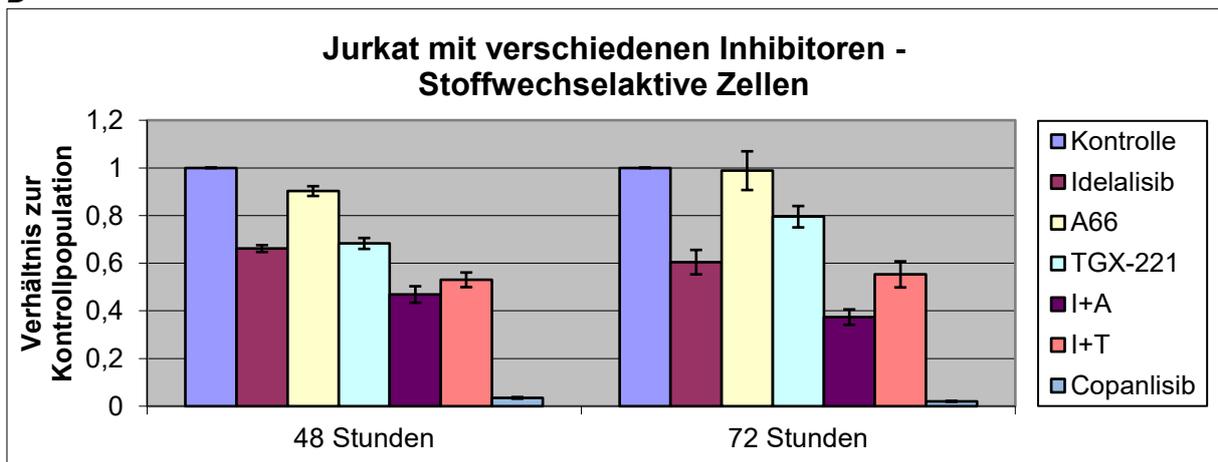


Abbildung 12 A–D: Verhältnis der stoffwechselaktiven Zellen zur unbehandelten Kontrollpopulation mit verschiedenen PI3K-Inhibitoren (5 μ M). Die Daten entstammen drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

4 Ergebnisse

Die Analyse der stoffwechselaktiven Zellen per WST-1-Assay bestätigt die bisher ermittelten Ergebnisse (Abb. 12 A–D). In der Zelllinie Granta-519 ist eine geringe Sensitivität auch für die Inhibitoren A66 und TGX-221 zu erkennen (Abb. 12 A). Die Sensitivität aller Zelllinien für Copanlisib fällt noch deutlicher auf als bei den vorangegangenen Vi-Cell™-Messungen.

4.3 Durchflusszytometrische Analysen der mit Copanlisib behandelten Zellen

Um die Ursache der deutlichen Wirksamkeit von Copanlisib genauer zu untersuchen, wurden sowohl Zellzyklusanalysen mittels PI-Färbung nach 24 Stunden als auch Apoptoseanalysen mittels PE Annexin V- und 7-AAD-Färbung nach 48 Stunden in einem Screening und weiteren Versuchen in der Arbeitsgruppe durchgeführt (Kap. 4.3.1.–4.3.4). Zur Analyse wurden die für Copanlisib sensitivste Zelllinie, Jeko-1, sowie die resistenteste Zelllinie, Granta-519, ausgewählt und die Ergebnisse hier bei Inhibitorkonzentrationen von 0 µM, 0,625 µM sowie 5 µM verglichen.

4 Ergebnisse

4.3.1 Zellzyklusanalyse (PI-Färbung) von Jeko-1 und Granta-519

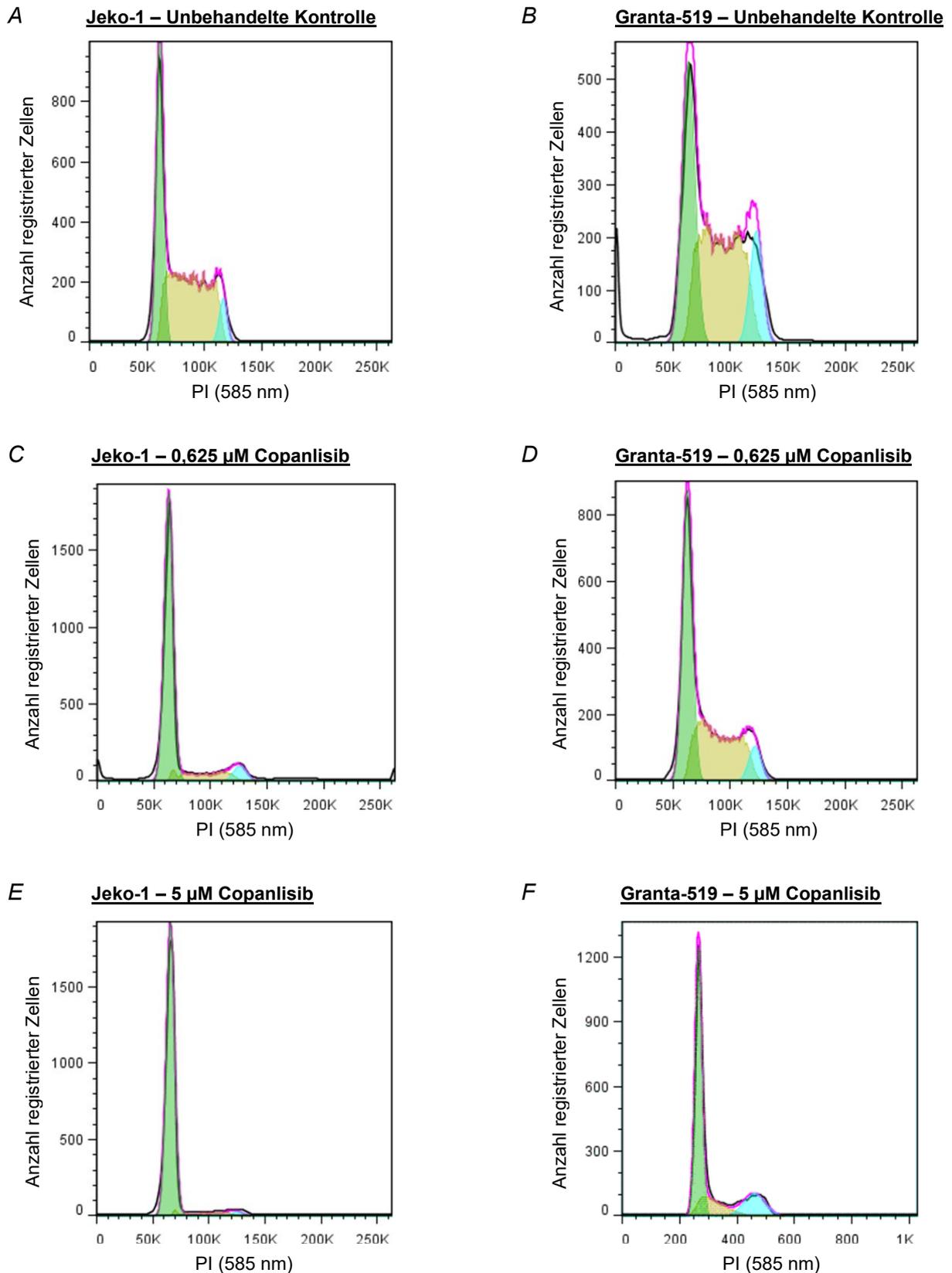


Abbildung 13 A–F: Zellzyklus der Zelllinien Jeko-1 und Granta-519 nach 24 Stunden in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration Copanlisib. Dargestellt sind repräsentative Einzelmessergebnisse von drei unabhängigen durchgeführten Versuchen.

4 Ergebnisse

In der graphischen Auswertung ist bereits zu erkennen, dass mit steigender Copanlisib-Konzentration bei beiden Zelllinien der Anteil an Zellen mit einfachem Chromosomensatz, und somit der sich in G1-Phase befindlichen Zellen, zunimmt (Abb. 13 A – F).

4.3.2 Vergleich der Zellzyklusanalyse von Jeko-1 und Granta-519

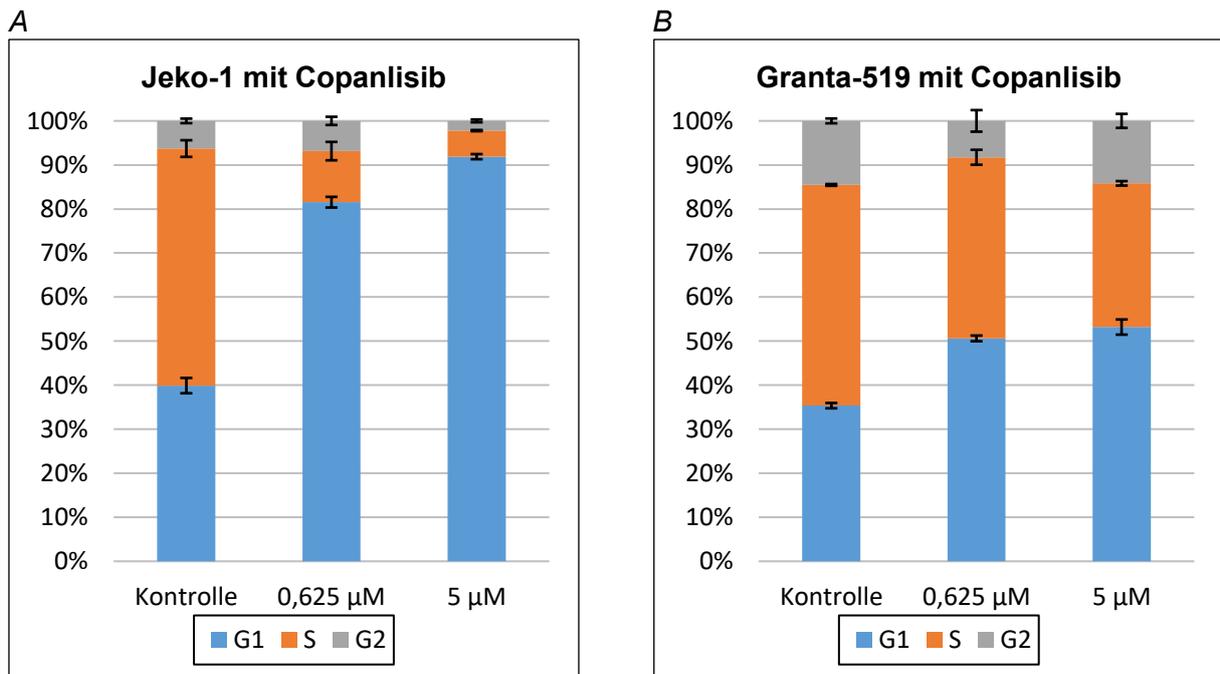


Abbildung 14 A – B: Zellzyklusphasen der Zelllinien Jeko-1 sowie Granta-519 nach 24 Stunden in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration Copanlisib. Die Daten entstammen drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

Bei Jeko-1-Zellen genügt bereits eine Copanlisib-Konzentration von 0,625 µM, um ungefähr eine Verdopplung der Zellen, welche sich in der G₁-Phase befinden, von ca. 40 % auf über 80 % zu erreichen (Abb. 14 A). Mit einer erhöhten Inhibitorkonzentration von 5 µM lässt sich dieser Wert auf über 90 % steigern. Granta-519-Zellen lassen sich hingegen deutlich schwerer in einen G₁-Arrest überführen (Abb. 14 B). Hierbei kann der Anteil der sich in der G₁-Phase befindlichen Zellen mit 0,625 µM Copanlisib nur von ca. 35 % auf ca. 50 % erhöht werden. Eine Inhibitorkonzentrationssteigerung auf 5 µM führt auch bei dieser Zelllinie nur noch zu einer geringen weiteren Steigerung dieses Werts.

4 Ergebnisse

4.3.3 Apoptoseanalyse (PE Annexin V- und 7-AAD-Färbung) von Jeko-1 und Granta-519

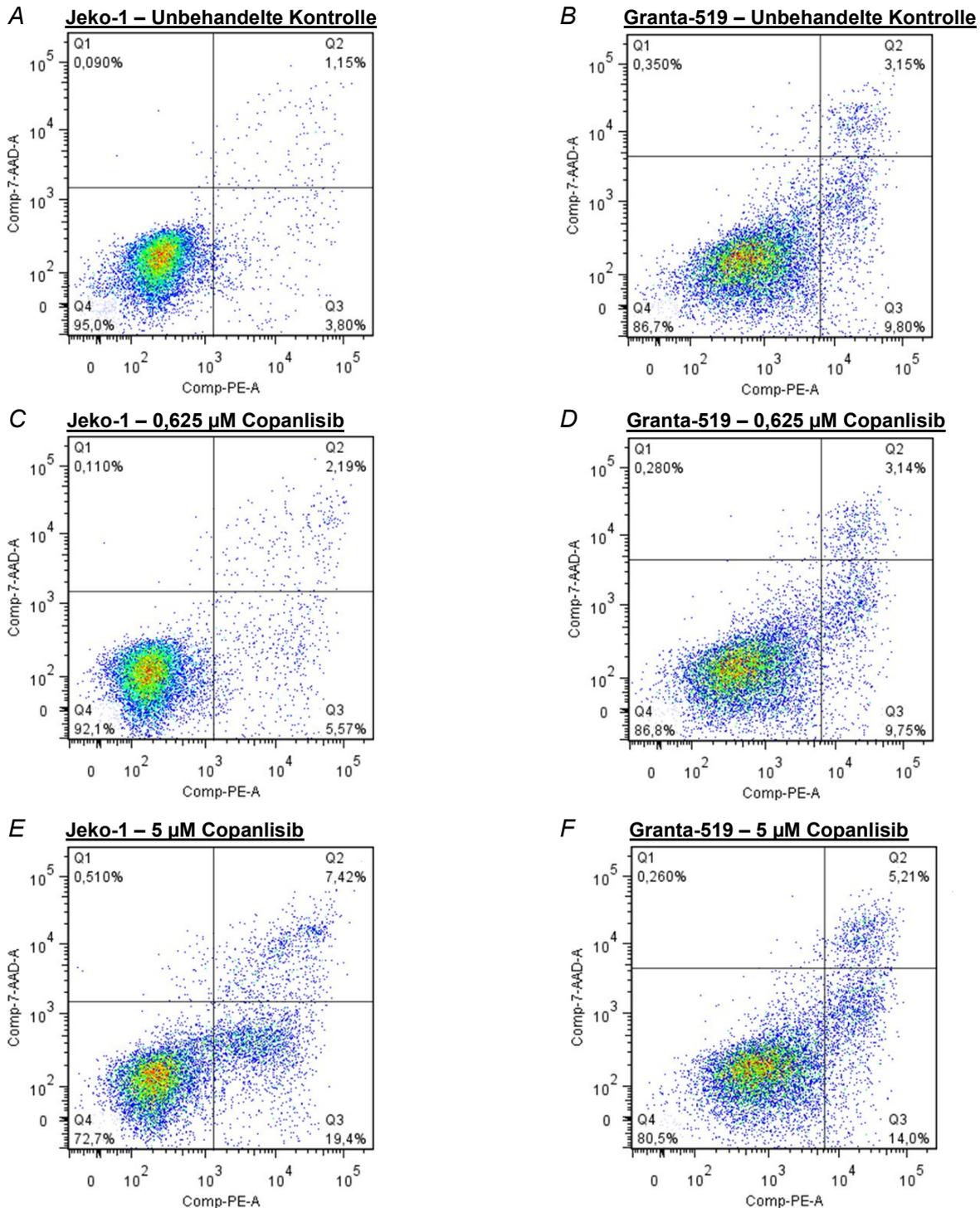


Abbildung 15 A–F: Früh- sowie spätapoptotische Zellen in den Zelllinien Jeko-1 und Granta-519 (PE Annexin V- und 7-AAD-Färbung) in Abhängigkeit von der Inhibitor-konzentration Copanlisib nach 48 Stunden. Dargestellt sind repräsentative Einzelmessergebnisse von drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Q1: PE Annexin V-ungefärbte und 7-AAD-gefärbte Zellen: Nicht zuzuordnende Zellen. Q2: PE Annexin V- und 7-AAD-gefärbte Zellen: Spätapoptotische Zellen. Q3: PE Annexin V-gefärbte und 7-AAD-ungefärbte Zellen: Frühapoptotische Zellen. Q4: PE Annexin V- und 7-AAD-ungefärbte Zellen: Nicht-apoptotische Zellen.

4 Ergebnisse

In der graphischen Auswertung ist bereits zu erkennen, dass bei beiden Zelllinien erst ab einer Copanlisib-Konzentration von über 0,625 μM der Anteil apoptotischer Zellen deutlich zunimmt (Abb. 15 A – F).

4.3.4 Vergleich der Apoptoseanalyse von Jeko-1 und Granta-519

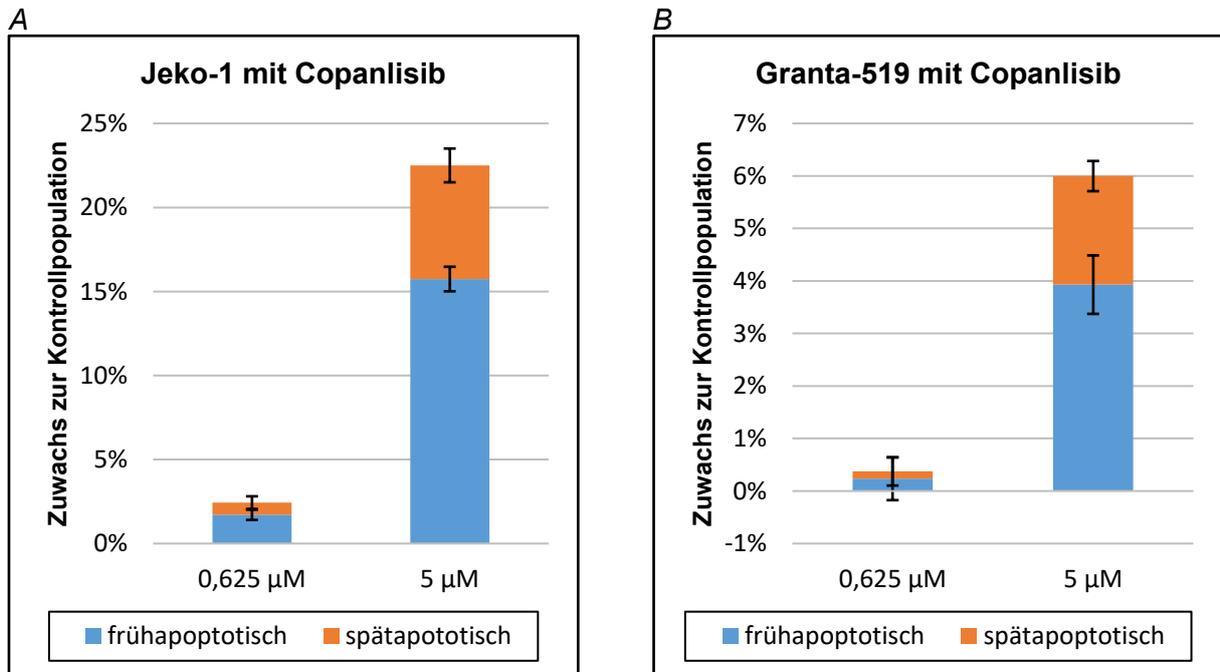


Abbildung 16 A–B: Früh- und spätapoptotische Zellen in den Zelllinien Jeko-1 sowie Granta-519 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollpopulation in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration Copanlisib nach 48 Stunden. Die Daten entstammen drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

Betrachtet man die Apoptoseanalysen der Zelllinien Jeko-1 und Granta-519, fällt auf, dass bei einer Inhibitorkonzentration von 0,625 μM Copanlisib kaum ein apoptotischer Effekt nachzuweisen ist; der Zuwachs apoptotischer Zellen nach 48 Stunden liegt jeweils unter 3 % (Abb. 16 A–B). Bei einer Konzentrationssteigerung auf 5 μM Copanlisib zeigt sich bei Jeko-1 mit ca. 22,5 % ein fast viermal höherer Anteil apoptotischer Zellen als bei Granta-519 mit ca. 6 %. Der Anteil frühapoptotischer Zellen ist dabei jeweils ungefähr doppelt so groß wie der Anteil spätapoptotischer Zellen.

4.4 Western Blot-Analysen der mit Copanlisib behandelten Zellen

Um die Wirkungsweise von Copanlisib, auch im Vergleich zu anderen Inhibitoren, genauer analysieren zu können, wurde das Western Blot-Verfahren nach 24-stündiger

4 Ergebnisse

Inhibitorbehandlung eingesetzt, um Änderungen von Proteinexpressionen in relevanten Zellsignalwegen sichtbar zu machen (Kap. 4.4.1 – 4.4.3). Die Inhibition und somit die geringere Phosphorylierung der PI3K-Untereinheiten selbst konnte nicht direkt analysiert werden, da entsprechende Antikörper nicht zur Verfügung stehen. Zunächst wurden Antikörper zum Nachweis der unphosphorylierten PI3K-Untereinheiten eingesetzt, um eine mögliche Hochregulation der nicht inhibierten Untereinheiten durch die Inhibitoren A66, Idelalisib, einer Kombination dieser und Copanlisib mit jeweils 5 μM zu detektieren (Kap. 4.4.1). Darauf folgend wurde anhand der Zelllinie Granta-519, welche nahezu nur auf Copanlisib sensibel reagiert, ein Screening der Proteinphosphorylierungen der Hauptsignaltransduktionswege (Akt / mTOR sowie Ras / Raf und p38 MAPK) mit Copanlisib und den Konzentrationen 0,625 μM sowie 5 μM durchgeführt (Kap. 4.4.2). Proteine, welche im Screening eine Änderung der Phosphorylierung unter Inhibitorbehandlung zeigten, wurden im Folgenden mit einem Vergleich zwischen den Inhibitoren A66, Idelalisib, der Kombination dieser Inhibitoren sowie Copanlisib bei einer Konzentration von jeweils 5 μM weiter untersucht (Kap. 4.4.3). Dieser Versuch wurde ebenfalls mit der auf Copanlisib am sensibelsten reagierenden Zelllinie Jeko-1 durchgeführt. Alle Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

4.4.1 PI3K-Untereinheiten

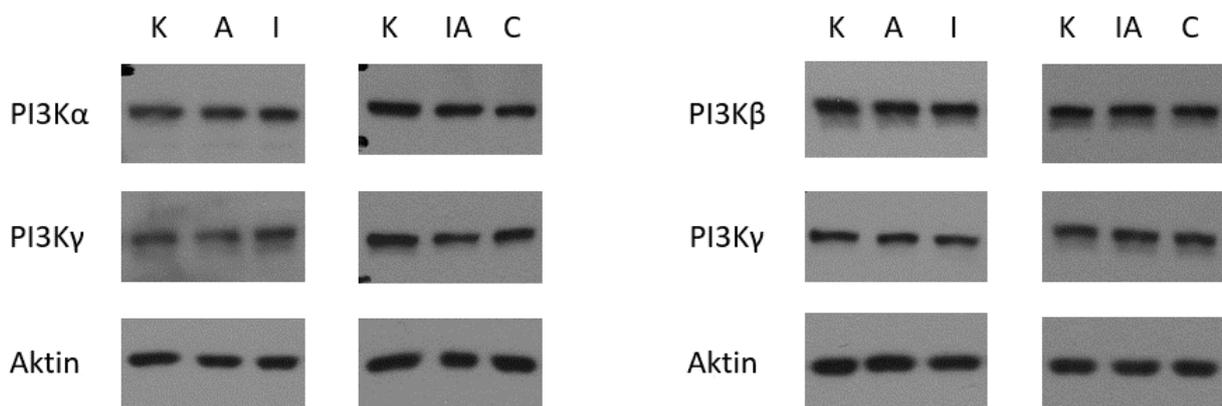


Abbildung 17: Western Blot der PI3K-Untereinheiten in der Zelllinie Granta-519 unter Inhibitoren A66 (A), Idelalisib (I), Idelalisib + A66 (IA) und Copanlisib (C) (jeweils 5 μM) nach 24 Stunden. Dargestellt sind repräsentative Einzelmessergebnisse von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Es zeigt sich keine Veränderung in der Expression der PI3K p110-Untereinheiten 24 Stunden nach einer Behandlung mit A66, Idelalisib, A66 + Idelalisib sowie Copanlisib und einer Konzentration von jeweils 5 μM (Abb. 17).

4 Ergebnisse

4.4.2 Screening der Signaltransduktionswege

4.4.2.1 Akt/mTOR-Signalweg

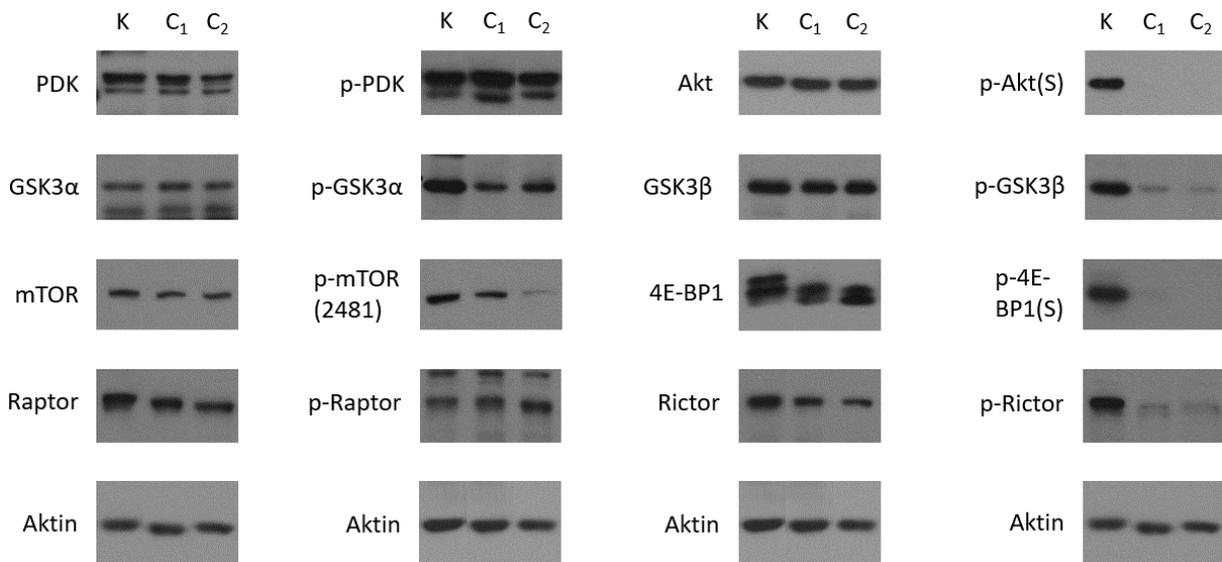


Abbildung 18: Western Blot des Akt/mTOR-Signalwegs der Zelllinie Granta-519 unter Inhibitor Copanlisib (0,625 μM (C₁) sowie 5 μM (C₂)) nach 24 Stunden. Dargestellt sind repräsentative Einzelmessergebnisse von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Während bei den Proteinen PDK und Raptor durch die Copanlisib-Behandlung keine Herunterregulation der Phosphorylierung erreicht werden kann, fällt sie bei Akt sowie auch nahezu bei 4E-BP1 schon bei einer Konzentration von 0,625 μM unter den nachweisbaren Bereich. Die restlichen getesteten Proteine zeigen ebenfalls eine durch die Inhibitorbehandlung verursachte Hemmung der Phosphorylierung, welche bei mTOR im Gegensatz zu GSK3α, GSK3β und Rictor konzentrationsabhängig ausfällt (Abb. 18).

4.4.2.2 Ras/Raf- und p38 MAPK-Signalweg

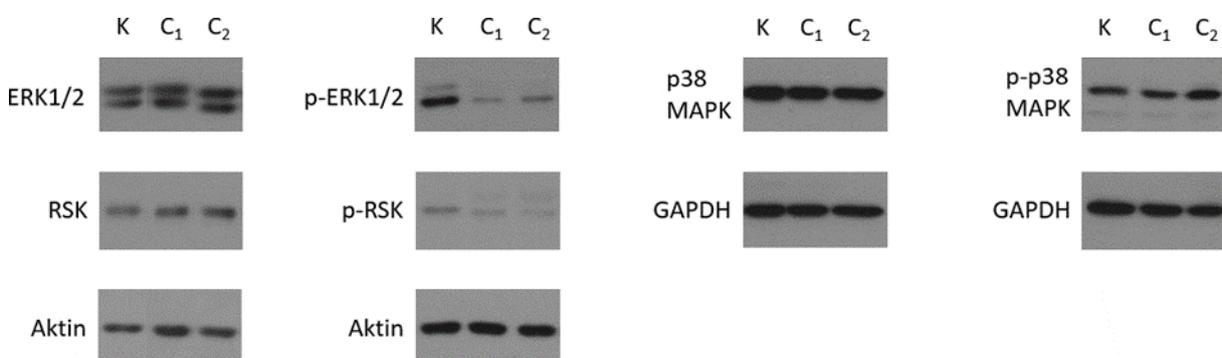
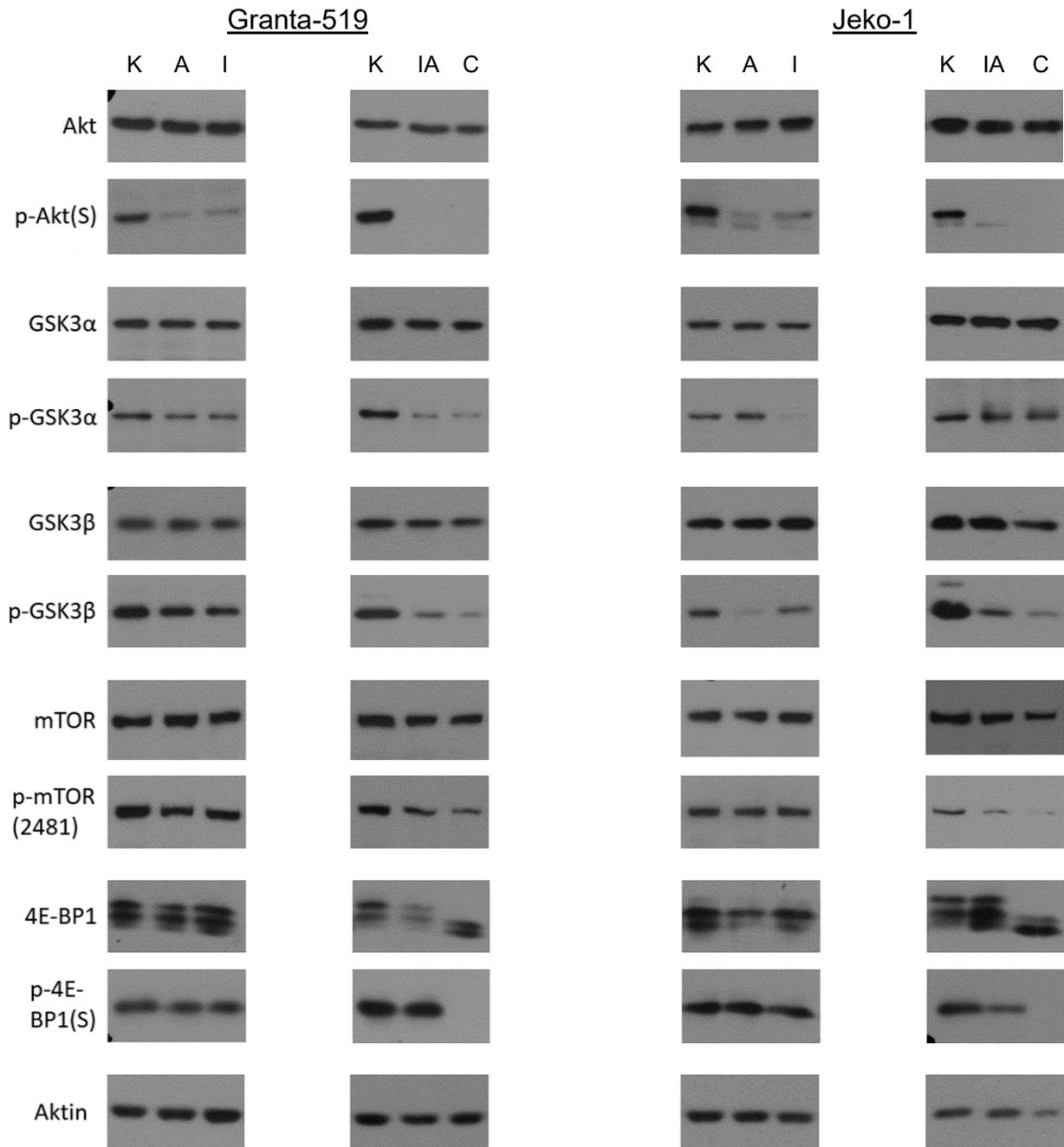


Abbildung 19: Western Blot des Ras/Raf- und des p38 MAPK-Signalwegs der Zelllinie Granta-519 unter Inhibitor Copanlisib (0,625 μM (C₁) sowie 5 μM (C₂)) nach 24 Stunden. Dargestellt sind repräsentative Einzelmessergebnisse von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

4 Ergebnisse

Eine Herunterregulation der phosphorylierten Form nach Copanlisib-Behandlung ist bei ERK1/2 sowie RSK zu erkennen, wobei sich letzteres weniger gut beurteilen lässt. Bei p38 MAPK hingegen fällt auf, dass eine höhere Inhibitorkonzentration eher zu einer leichten Hochregulation der phosphorylierten Form führt (Abb. 19).

4.4.3 Copanlisib-sensitive Proteine



4 Ergebnisse

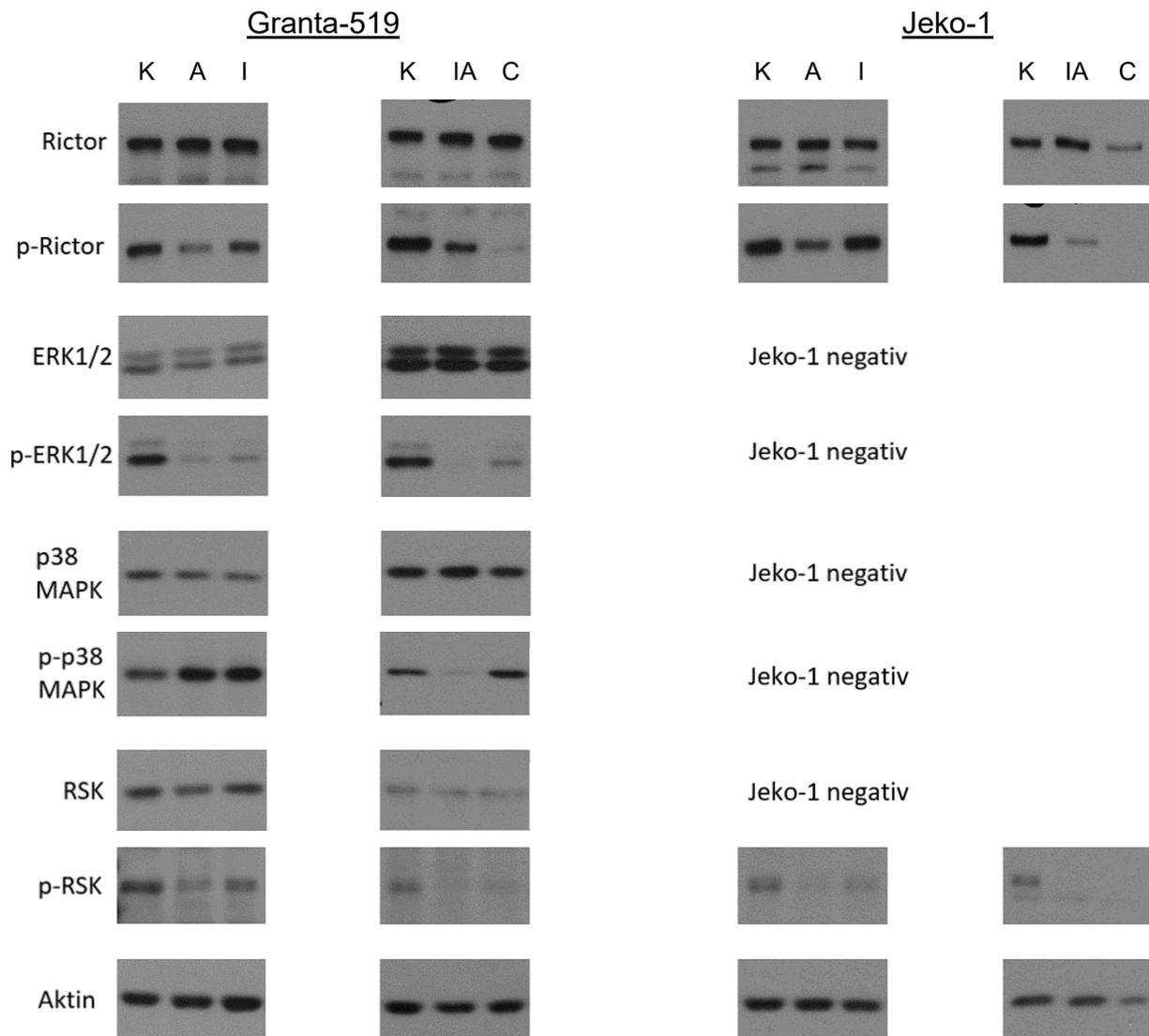


Abbildung 20: Western Blot der Copanlisib-sensitiven Proteine des Akt / mTOR- und Ras / Raf- und p38 MAPK-Signalwegs der Zelllinien Granta-519 sowie Jeko-1 unter den Inhibitoren A66 (A), Idelalisib (I), Idelalisib + A66 (IA) sowie Copanlisib (C) (je 5 μ M) nach 24 Stunden. Dargestellt sind repräsentative Einzelmessergebnisse von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Die Western Blot-Ergebnisse nach Behandlung mit Copanlisib zeigen für die Phosphorylierung einiger Proteine ähnliche Effekte wie nach Behandlung mit der Kombination von Idelalisib + A66 (Abb. 20). Dies ist vor allem bei den Proteinen Akt und GSK3 α/β zu erkennen. Während bei den Proteinen 4E-BP1 sowie Rictor die Herunterregulation der Phosphorylierung durch Copanlisib deutlich stärker ausfällt als durch eine Kombination von Idelalisib + A66, ist bei den Proteinen ERK1/2 sowie p38 MAPK das Gegenteil zu beobachten. Deutliche Reduktionen der Phosphorylierungen durch Monotherapien mit A66 oder Idelalisib zeigen sich nur bei den Proteinen Akt sowie ERK1/2.

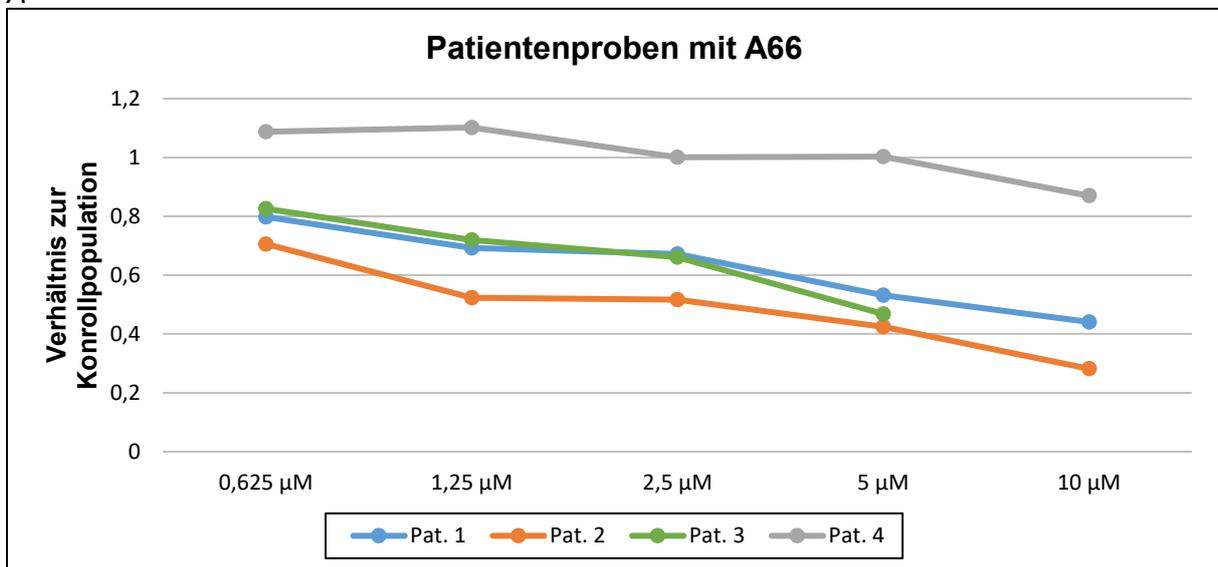
4 Ergebnisse

4.5 Ergebnisse von Patientenproben

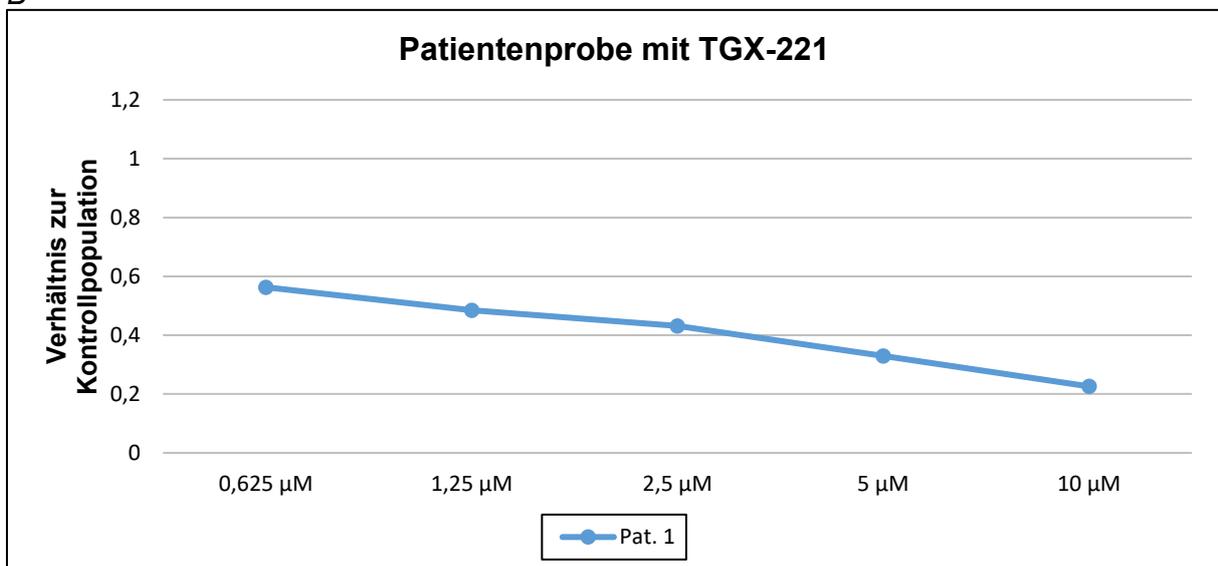
Zusätzlich wurden auch MCL-Patientenproben mit PI3K-Inhibitoren behandelt und mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen verglichen (Kap. 4.5.1 – 4.5.2). Gemessen wurde nach 72 Stunden der Anteil der stoffwechselaktiven Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollpopulation mittels CellTiter-Glo®-Assay (Kap. 4.5.1). Dieses Messverfahren beruht auf einer Detektion des in den Proben enthaltenen ATP und der Tatsache, dass dessen Menge direkt proportional zur Zahl der in der Probe enthaltenden stoffwechselaktiven Zellen ist.

4.5.1 Versuchsergebnisse

A

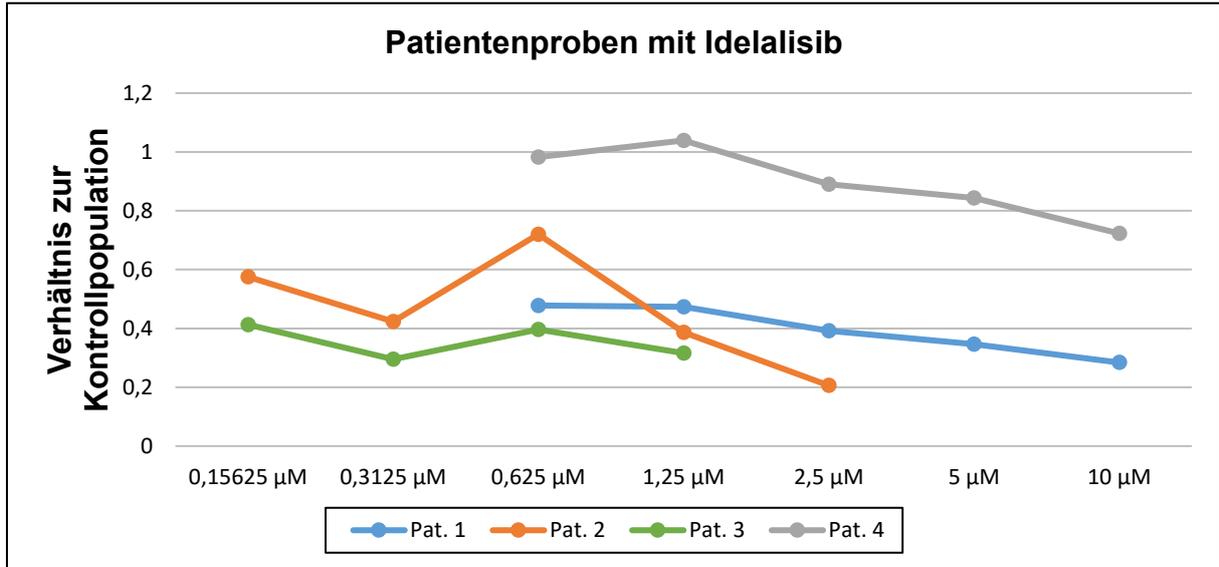


B



4 Ergebnisse

C



D

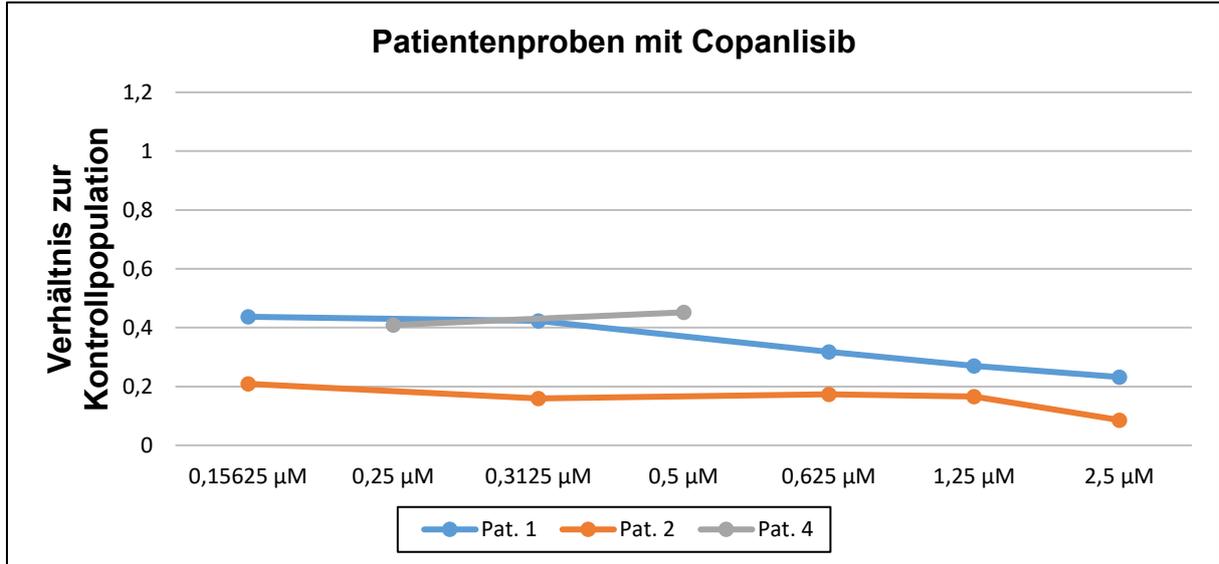


Abbildung 21 A–D: Verhältnis der stoffwechselaktiven Zellen bei Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren im Vergleich zur unbehandelten Kontrollpopulation nach 72 Stunden.

Mittlere inhibitorische Konzentrationen (IC_{50})

	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Pat. 4
A66	6,74	2,33	4,99	nicht berechenbar
TGX-221	1,15	keine Daten	keine Daten	keine Daten
Idelalisib	0,63	0,44	0,02	22,53
Copanlisib	0,09	< 0,005	keine Daten	0,18

Tabelle 14: Mittlere inhibitorische Konzentrationen (IC_{50}) bei den untersuchten MCL-Patientenproben für verschiedene Inhibitoren nach 72 Stunden. (Datentransfer aus Abbildung 21 A – D.)

4 Ergebnisse

Vergleicht man die gewonnenen Werte aus Proben desselben Patienten miteinander, so fällt auf, dass die MCL-Zellen am sensitivsten gegenüber Copanlisib sind (Abb. 21 A – D und Tab. 14). Am zweiteffektivsten zeigt sich Idelalisib vor A66 und TGX-221, wobei bei letzterem lediglich eine Patientenprobe zur Verfügung steht. Die Daten zeigen weiterhin, dass MCL-Zellen verschiedener Patienten ein unterschiedlich starkes Ansprechen auf die Inhibitoren aufweisen. Zellen des Patienten 4 waren deutlich resistenter gegenüber allen getesteten Inhibitoren als die Zellen der übrigen Patienten. Weitere Analysen der Patientenproben liegen leider nicht vor.

4.5.2 Vergleich von Patientenproben und Zelllinien

Bei einem Vergleich der Daten aus Patientenproben mit den Daten aus Zelllinien zeigt sich, dass die MCL-Zellen in beiden Gruppen am sensitivsten auf eine Therapie mit Copanlisib reagieren (Kap. 4.2 und 4.5). Eine weitere Gemeinsamkeit stellt das unterschiedlich starke Ansprechen verschiedener Zellproben auf die einzelnen Inhibitoren dar. Bei den ermittelten IC_{50} -Werten für Copanlisib zeigen sich dabei sowohl zwischen den Zelllinien als auch zwischen den Patientenproben Unterschiede von mehr als einer Größenordnung. (Abb. 9 und Tab. 14). Ein direkter Vergleich der jeweiligen IC_{50} -Werte ist durch die unterschiedlichen experimentellen Wachstumsbedingungen allerdings nicht möglich.

5 Diskussion

5.1 Antiproliferativer Effekt von Copanlisib

Nachdem die Wirksamkeit von Copanlisib in den letzten Jahren bereits bei einigen anderen hämatologischen und nicht-hämatologischen Tumorzelllinien getestet wurde, war es das erste Ziel dieser Arbeit, eine Untersuchung der Wirkstärke des PI3K-Inhibitors in verschiedenen Mantelzelllymphomzelllinien vorzunehmen. Um eine gewisse Bandbreite an genetischen Variationen abzudecken, wurden sechs verschiedene Zelllinien (Granta-519, Jeko-1, Maver, Mino, Rec-1 und Z-138) untersucht.

Ein über die ersten 72 Stunden anhaltender antiproliferativer Effekt konnte bei allen getesteten Zelllinien beobachtet werden, wobei sich die Werte der mittleren inhibitorischen Konzentration teils deutlich unterschieden. Während sich die IC_{50} -Werte der Zelllinien Maver, Mino, Rec-1 und Z-138 alle im Bereich zwischen 0,21 und 0,35 μM Copanlisib befanden, stellte sich die Zelllinie Jeko-1 mit einem IC_{50} -Wert von 0,02 μM als besonders sensibel und die Zelllinie Granta-519 mit einem IC_{50} -Wert von 1,26 μM als besonders resistent dar. Liu et al. zeigte, dass nach Copanlisib-Behandlung auch innerhalb anderer Tumorgrunderkrankungen, wie zum Beispiel bei Brustkrebs oder dem Multiplen Myelom, bei verschiedenen Zelllinien deutlich unterschiedliche IC_{50} -Werte gemessen werden können. Innerhalb der Brustkrebszelllinien sowie zuletzt auch bei Patientenproben des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms deuten bestimmte genetische Veränderungen auf ein tendenziell gutes bzw. schlechtes Ansprechen auf Copanlisib hin. (Liu et al., 2013) (Lenz et al., 2020) Bei Mantelzelllymphomzelllinien gibt es in dieser Hinsicht bisher keine Informationen. Auch ein Vergleich der 25 in Mantelzelllymphomen am häufigsten vorkommenden Genmutationen, welche von Beà et al. unter anderem für die Zelllinien Jeko-1, Maver, Mino, Rec-1 und Z-138 untersucht wurden, liefert keine entsprechenden Hinweise. (Bea et al., 2013)

5.2 Selektive und kombinierte Inhibition von einzelnen PI3K-Isoformen

Beim Vergleich des Inhibitors Copanlisib mit selektiven PI3K-Inhibitoren für die Untereinheiten α , β und δ zeigte sich eine Monotherapie gegen die einzelnen Untereinheiten bezüglich der Proliferationshemmung immer unterlegen. In ähnlicher Art untersuchte Tabe et al. die Wirkung des PI3K α - und - δ -Inhibitors Pictilisib im

5 Diskussion

Vergleich zu den selektiven Inhibitoren PI3K α inhibitor IV (Inhibitor der α -Untereinheit) und IC87114 (Inhibitor der δ -Untereinheit) nach 48 Stunden mittels Trypan-Ausschlusstest an Mantelzelllymphomzellen von zwei Patienten. Auch dort zeigte sich eine Überlegenheit des dualen Inhibitors, jedoch weiterhin auch eine deutliche Überlegenheit des α -Inhibitors gegenüber dem δ -Inhibitor. (Tabe et al., 2014) Letztere konnte durch die Versuche der vorliegenden Arbeit mit anderen Inhibitoren der gleichen Untereinheiten an den getesteten Zelllinien nicht bestätigt werden. Die Ursache für die hohe Empfindlichkeit der Zelllinien in jener Arbeit in verschiedenen Versuchen auf den PI3K α -Inhibitor könnte eine verminderte Spezifität der Substanz sein. In der Arbeit wurde kein direkter Vergleich der IC₅₀-Werte bezüglich der Hemmung von p110 α und p110 δ berichtet. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen von MCL-Patientenproben reagierten auf den Dualinhibitor Copanlisib deutlich sensibler als auf die Monoinhibitoren A66, TGX-221 und Idelalisib. Das insgesamt schlechte Ansprechen auf die Inhibition der β -Untereinheit kann auf deren generell niedrige Expression in Mantelzelllymphomen zurückgeführt werden, welche auch von Iyengar et al. anhand einer Kohorte von über 100 Patienten bestätigt wurde. Der δ -Untereinheit kommt hingegen in dem Sinne eine besondere Bedeutung zu, als dass sie in Mantelzelllymphomzellen deutlich überexprimiert auftritt. (Iyengar et al., 2013)

Dass jedoch auch eine alleinige spezifische Inhibition der δ -Untereinheit in der vorliegenden Arbeit nicht zu einem wirkungsvollen antiproliferativen Effekt führte, steht im Einklang mit den Ergebnissen einer bereits durchgeführten Phase I-Studie, in der Patienten mit rezidivierender oder refraktärer MCL-Erkrankung auf eine Therapie mit Idelalisib nur ein kurzes Ansprechen zeigten, im Besonderen, wenn bereits eine stärkere Vorbehandlung stattgefunden hatte. (Kahl et al., 2014) Eine mögliche Ursache kann die mittlerweile bei Mantelzelllymphomzellen beschriebene erhöhte Expression der PI3K α -Untereinheit, im Besonderen nach Rückfällen, sein, welche eine Resistenz gegenüber der alleinigen δ -Inhibition zur Folge hat. Ob dieses Phänomen direkt durch die Chemotherapeutika induziert wird oder sich für entsprechende Zellen lediglich ein Selektionsvorteil ergibt, konnte noch nicht gezeigt werden. Untersuchungen in diesem Zusammenhang zeigten folgerichtig, dass das kombinierte Inhibieren der δ - und α -Untereinheit mit dem Inhibitor Pictilisib zu einer signifikant stärkeren Wachstumshemmung und niedrigeren Zellviabilität führt. (Iyengar et al., 2013) Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich entsprechend die kombinierte

5 Diskussion

Inhibition der δ - und α -Untereinheit mittels Idelalisib und A66 als deutlich effektiver und in mehreren Experimenten sogar als synergistisch, während diese Effekte bei einer kombinierten Inhibition der δ - und β -Untereinheit mittels Idelalisib und TGX-221 nicht beobachtet wurden.

Des Weiteren konnte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit durch den Vergleich mit der T-ALL-Kontrollzelllinie Jurkat gezeigt werden, dass der Wirkmechanismus der PI3K-Inhibitoren, inklusive Copanlisib, nicht spezifisch für Mantelzelllymphomzelllinien ist.

Die mittels Vi-Cell™-Messungen bestimmte Effektivität der getesteten Inhibitoren und Inhibitorkonzentrationen auf die Proliferation der Zellen konnte durch die Erfassung stoffwechselaktiver Zellen mit Hilfe des WST-1-Assays bestätigt werden. Die besonders hohe Wirksamkeit von Copanlisib fiel dabei noch deutlicher auf. Tabe et al. untersuchte die Wirkung des PI3K α - und - δ -Inhibitors Pictilisib mittels MTS-Assay, unter anderem auch in den Zelllinien Granta-519 und Jeko-1. Bei verschiedenen Konzentrationen (0,1 μ M, 0,5 μ M und 1,0 μ M) zeigte sich dabei Granta-519 ebenfalls deutlich resistenter als Jeko-1. (Tabe et al., 2014)

Um die Wirkungsweise von Copanlisib genauer zu untersuchen, wurden Zellzyklusanalysen 24 Stunden nach Inhibitorapplikation an der empfindlichsten und resistantesten Zelllinie verglichen. Bei beiden Zelllinien konnte bereits bei einer Konzentration von 0,625 μ M ein G₁-Arrest erreicht werden. Der Effekt trat jedoch bei der sensibleren Zelllinie Jeko-1 weitaus deutlicher auf. Eine achtfach höhere Inhibitorkonzentration führte nur noch zu einer geringen weiteren Steigerung des Anteils der Zellen in G₁-Phase. Das Induzieren eines Zellzyklusarrests in der G₁-Phase durch Copanlisib wurde auch bereits in NK-Zell-Lymphomzelllinien beobachtet. (Huang et al., 2020) Tabe et al. führte an den Zelllinien Jeko-1 und Granta-519 ebenfalls Zellzyklusanalysen durch. Diese wurden mit selektiven und nicht-selektiven PI3K-Inhibitoren, welche, abgesehen von TGX-221, nicht in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen, durchgeführt und nach 48 Stunden ausgewertet. Auch dabei konnte ein deutlicher G₁-Arrest bei einigen der Inhibitoren, unter anderem auch beim PI3K α - und - δ -Inhibitor Pictilisib, ermittelt werden. Dazu anzumerken ist, dass im Versuch mit dem Inhibitor Pictilisib bei beiden Zelllinien der Anteil der Zellen in G₁-Phase um ungefähr den gleichen Faktor anstieg. (Tabe et al., 2014)

Neben den Zellzyklusanalysen wurde in der vorliegenden Arbeit bei den Zelllinien Jeko-1 und Granta-519 auch der Zuwachs früh- und spätapoptotischer Zellen

5 Diskussion

48 Stunden nach Copanlisib-Behandlung verglichen. Bei einer Konzentration von 0,625 μM des PI3K-Inhibitors konnte in beiden Zelllinien kaum ein Zuwachs an apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. Bei 5 μM Copanlisib zeigte sich in beiden Zelllinien jeweils eine deutliche Steigerung frühapoptotischer und in geringerem Umfang auch spätapoptotischer Zellen. Insgesamt war Jeko-1 auch in dieser Hinsicht mit einer Zunahme der Zellapoptose von ca. 22,5 % deutlich sensibler als Granta-519 mit ca. 6 %. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Versuchen von Tarantelli et al., welche bei einer Copanlisib-Konzentration von 0,3 μM ebenfalls kaum eine Zunahme an apoptotischen Zellen bei Jeko-1 zeigten. In jener Arbeit konnte jedoch an zwei MCL-Patientenproben bereits mit einer Inhibitorkonzentration von 0,2 μM eine deutliche apoptoseinduzierende Wirkung erzielt werden. Weiterhin konnten auch bei verschiedenen Marginalzonenlymphomzelllinien, DLBCL-Zelllinien und Brustkrebszelllinien deutliche Zunahmen apoptotischer Zellen bereits bei Konzentrationen von $\leq 0,3 \mu\text{M}$ Copanlisib gezeigt werden. (Will et al., 2014) (Bojarczuk et al., 2019) (Tarantelli et al., 2020)

5.3 Effektivität von Copanlisib und kombinierter Inhibition von PI3K α und δ

Um die stärkere Wirkung von Copanlisib auch im Vergleich zur Kombination der selektiven PI3K-Inhibitoren Idelalisib und A66 zu erklären, wurden Western Blot-Analysen des Akt/mTOR- sowie des Ras/Raf- und des p38 MAPK-Signalwegs durchgeführt. Es sei noch einmal auf die Übersichtsgrafik in 1.2.1 verwiesen, welche einen Überblick über verschiedene Proteine entlang dieser Signalwege gibt. Ein Screening der Phosphorylierung wichtiger PI3K-nachgeschalteter Proteine wurde anhand der Zelllinie Granta-519 vorgenommen. Proteine mit geändertem Phosphorylierungsmuster wurden zum Vergleich ebenfalls bei der Zelllinie Jeko-1 untersucht. Wie anhand der bekannten Signalwege zu erwarten, wiesen wichtige PI3K-nachgelagerte downstream Proteine nach Copanlisib-Behandlung meist deutliche, teils inhibitor konzentrationsabhängige, Phosphorylierungsänderungen auf, wobei die verstärkte Phosphorylierung der p38 MAPK dabei einen Indikator für den Zellstress darstellt.

Besonders effektiv fiel die Herunterregulierung des p-Akt aus, welches durch nachgeschaltete Signalwege das Zellwachstum, die Zellproliferation und das Zellüberleben fördert sowie die Apoptose inhibiert und indirekt an der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κB und damit unter anderem an der

5 Diskussion

Regulation der Cyclin D1-Expression beteiligt ist. (Ali et al., 2001) (Igney et al., 2002) (Dal Porto et al., 2004) (Cargnello et al., 2011) (Magnuson et al., 2012) Schon bei einer Copanlisib-Konzentration von 0,625 μM konnte mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Western Blot-Methode kein p-Akt mehr nachgewiesen werden. Die deutliche Herunterregulierung des p-Akt-Wegs durch Copanlisib bei MCL-Zelllinien reiht sich damit in die Ergebnisse ein, welche in Versuchen an vielen anderen Krebszelllinien, unter anderem an verschiedenen Blutkrebs- sowie Brustkrebszelllinien, ermittelt wurden. Ebenso wurde die Inhibition des Ras/Raf-Signalwegs durch Copanlisib bei vielen jener Zelllinien, bei welchen die beteiligten Proteine keine Mutationen aufweisen, bereits beschrieben. In der Arbeit von Will et al. wurde bei Experimenten mit Brustkrebszelllinien zusätzlich verdeutlicht, dass der Inhibition des Ras-Signalwegs eine wichtige Bedeutung bei der Apoptoseinduktion zukommt. Da es bei der Copanlisib-Therapie in Folge der Inhibition des Akt-Signalwegs durch das Wegfallen von Feedbackmechanismen nach einiger Zeit wieder zu einer Aktivierung von Ras kam, scheint eine intermittierende Gabe nicht nur aufgrund reduzierter Nebenwirkungen, sondern auch zur Steigerung der Wirksamkeit überlegen. (Will et al., 2014) Bei ersten klinischen Anwendungen von Copanlisib, auf die im weiteren Verlauf noch genauer eingegangen wird, wurde Copanlisib in wöchentlichem bzw. zweiwöchentlichem Abstand verabreicht.

4E-BP1, welches phosphoryliert ebenfalls bei einer Konzentration von 0,625 μM Copanlisib in der vorliegenden Arbeit bei den untersuchten MCL-Zelllinien nicht mehr sicher nachgewiesen werden konnte, löst sich in phosphorylierter Form von eIF4E, welches somit für den Translationsfaktor eIF4F zur Verfügung steht. (Konicek et al., 2008) Wenn im Folgenden über die phosphorylierte Form von 4E-BP1 gesprochen wird, bezieht sich dies, wie auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Western Blots, auf eine Phosphorylierung an Ser65. Sobald 4E-BP1 dort phosphoryliert ist, besteht keine Möglichkeit der Bindung an eIF4E mehr. (Mothe-Satney et al., 2000) Dass durch eine Behandlung mit Copanlisib, im Vergleich zu Monotherapien mit Idelalisib und dem PI3K α -Inhibitor Alpelisib, sowohl eine stärkere Herunterregulation von p-Akt als auch von p-4E-BP1 erreicht wird, beschrieb Huang et al. auch bei verschiedenen NK-Zell-Lymphomzelllinien. (Huang et al., 2020)

Betrachtet man nun die unterschiedlichen Auswirkungen der verschiedenen getesteten Inhibitoren auf die Proteine der PI3K-Signalwege, stellt sich heraus, dass eine Monotherapie mit A66 oder Idelalisib nicht in der Lage war, die Phosphorylierung

5 Diskussion

eines der untersuchten Proteine unter die Nachweisgrenze zu senken. Trotzdem wurden Herunterregulierungen sowohl im Akt/mTOR- als auch im Ras/Raf-Signalweg beobachtet sowie ein erhöhter Zellstress durch eine Hochregulierung von p-p38 MAPK nachgewiesen.

Eine merklich stärkere Hemmung der Signalwege war bei der kombinierten Inhibition der α - und δ -Untereinheit von PI3K durch A66 und Idelalisib zu erkennen, wobei kein phosphoryliertes Akt mehr nachgewiesen werden konnte. Tabe et al. kam bei den Zelllinien Granta-519 und Jeko-1 mithilfe der Inhibitoren PI3K α inhibitor IV (selektiver p110 α -Inhibitor), IC87114 (selektiver p110 δ -Inhibitor) und Pictilisib (kombinierter p110 α - und p110 δ -Inhibitor) zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich p-Akt und p-GSK3 β . Allerdings war die besondere Effektivität von PI3K α inhibitor IV gegenüber p-Akt, welche bei 1 μ M an die von Pictilisib heranreichte und die Phosphorylierung bei 5 μ M unter die Nachweisgrenze senkte, auffallend. (Tabe et al., 2014) Hier sei wieder auf die eventuell verminderte Spezifität von PI3K α inhibitor IV verwiesen.

Die bei den Versuchen zur Proliferationshemmung entdeckte deutlich stärkere Wirksamkeit von Copanlisib gegenüber der Kombination aus Idelalisib und A66, mit Inhibition der gleichen PI3K-Untereinheiten, wirft jedoch die Frage nach einem zusätzlichen Wirkmechanismus von Copanlisib auf. Neben der Tatsache, dass die Aktivität einiger Proteine des Akt/mTOR-Signalwegs durch Copanlisib stärker herunterreguliert wurde, fallen besonders die Unterschiede bezüglich des 4E-Binding Protein 1 auf. In Granta-519 war es weder durch die getesteten Monotherapien der Inhibitoren Idelalisib und A66 noch durch deren Kombination in einer Konzentration von 5 μ M möglich, die Phosphorylierung von 4E-BP1 herunterzuregulieren, während bereits bei einem Achtel der Konzentration an Copanlisib die phosphorylierte Form nicht mehr sicher nachgewiesen werden konnte. Bei einem Vergleich mit der Zelllinie Jeko-1, welche sich gegenüber der Kombination von Idelalisib und A66 deutlich sensibler zeigte, fällt ein ähnliches Phänomen auf, doch scheint hier auch die Kombination der Einzelinhibitoren eine geringe Herunterregulation von p-4E-BP1 auslösen zu können. Bei gleichen Inhibitorkonzentrationen war Copanlisib wiederum deutlich überlegen.

Ein weiteres Protein, welches auf ähnliche Weise wie 4E-BP1 reagierte, stellt der mTORC2-Komplex-Bestandteil Rictor dar. Während Idelalisib in Kombination mit A66 bei Granta-519 kaum eine Inhibition der Phosphorylierung erreichen konnte, war diese

5 Diskussion

bei Jeko-1 weitaus deutlicher zu beobachten. In beiden Fällen zeigte sich Copanlisib jedoch weit effektiver.

Interessanterweise konnte Feldman et al. zeigen, dass der selektive mTOR-Inhibitor PP242, im Gegensatz zum mTORC1-Inhibitor Rapamycin, ebenfalls in der Lage ist, eine Phosphorylierung von 4E-BP1 an Ser65 vollständig zu inhibieren. Die Hypothese, dass dies eine Folge der zusätzlichen Inhibition von mTORC2 ist, konnte in derselben Arbeit widerlegt werden, weshalb auf eine vollständigere mTORC1-Inhibition durch PP242 geschlossen wurde. (Feldman et al., 2009) Möglicherweise ist auch Copanlisib, im Gegensatz zu den anderen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Inhibitoren und Inhibitorkombinationen, in der Lage, mTORC1 vollständiger zu inhibieren.

Dass Copanlisib keinen direkten inhibitorischen Einfluss auf 4E-BP1 ausübt, konnte Liu et al. in einer Arbeit zeigen. Dabei wurde die Selektivität von Copanlisib gegenüber verschiedenen Proteinen mit Hilfe der Zelllinie ELT3 untersucht. Bei ELT3 handelt es sich um eine Leiomyomzelllinie aus Eker-Ratten. (Walker et al., 2003) In dieser wird der mTORC1-Komplex, durch ein Fehlen von TSC2, unabhängig von vorgeschalteten Proteinen aktiviert. Während Copanlisib in dieser Zelllinie bereits bei einer Konzentration von 5 nM eine Herunterregulation von p-Akt unter die Nachweisgrenze erreichen konnte, war eine einhundertfach höhere Konzentration nicht in der Lage, die Phosphorylierung von 4E-BP1 zu beeinflussen. Durch eine Behandlung der Zellen mit dem kombinierten PI3K- und mTOR-Inhibitor BEZ-235 war dies jedoch möglich. (Liu et al., 2013)

Heesom et al. zeigte anhand von Zellen der HeLa-Zelllinie, dass 4E-BP1 während des Zellzyklus vor allem in der M- und G₁-Phase in phosphorylierter und somit von eIF4E dissoziierter Form vorliegt. (Heesom et al., 2001) Eine große Bedeutung dieser Dissoziation ist darin begründet, dass eIF4E in freier Form sowohl zum Zellwachstum als auch zum Fortschreiten des Zellzyklus, vor allem durch einen G₁-/S-Phase-Übergang, beiträgt. (Fingar et al., 2004) Diese Tatsache bezieht sich möglicherweise auch auf den in dieser Arbeit beschriebenen deutlichen G₁-Arrest nach Therapie mit Copanlisib.

Durch die Mitwirkung von eIF4E an der Aktivierung der Cap-Struktur-abhängigen Translation werden nach einer Phosphorylierung von 4E-BP1 unter anderem die Proteine Cyclin D1 und PIM stärker exprimiert. (Nawijn et al., 2011) Der PIM-Kinase-Familie kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. Nicht nur ist PIM2 seinerseits wieder in der Lage, 4E-BP1 mTOR-unabhängig zu phosphorylieren. Die PIM-Proteine,

5 Diskussion

welche bei erhöhter Expression in Mantelzelllymphomen mit einer schlechteren Prognose einhergehen, sind auch über 4E-BP1-unabhängige Signalwege an einem Zellzyklusfortschreiten und gesteigerten Zellüberleben beteiligt. (Nawijn et al., 2011) Auch in den Zellen der Zelllinie Jeko-1 konnte eine Expression der PIM-Kinasen, insbesondere auch von PIM2, festgestellt werden. (Yang et al., 2012) Da nach einer Copanlisib-Therapie dieser Zellen, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, schon bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen kein phosphoryliertes 4E-BP1 mehr nachweisbar ist und, wie bereits diskutiert, auch von keiner direkten Wirkung von Copanlisib auf das Protein ausgegangen werden kann, stellt sich die Frage nach dem Einfluss des Inhibitors auf den PIM-Kinase-Signalweg. Die anscheinend nur noch in geringerem Ausmaß stattfindende Umgehung des mTOR-Signalwegs zur Phosphorylierung von 4E-BP1 könnte auf eine herunterregulierte Expression von PIM-Kinasen und somit auch 4E-BP1-unabhängige Zelleinflüsse schließen lassen. Dieser Effekt könnte ebenfalls eine Ursache der überlegenen Wirksamkeit des Inhibitors gegenüber den anderen getesteten Substanzen sein. Dass die Aktivität von PIM-Kinasen jedoch durch Copanlisib nicht vollständig inhibiert werden kann, zeigte Tarantelli et al. in Bezug auf die MCL-Zelllinien Maver, Mino und Z-138. Hierbei zeigten sich additive bis synergistische Wirkungen in der Reduktion stoffwechselaktiver Zellen, wenn die Zelllinien neben Copanlisib zusätzlich mit dem PIM-Kinasen-Inhibitor AZD1208 behandelt wurden. (Tarantelli et al., 2020)

Pham et al. konnte zeigen, dass auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B in Mantelzelllymphomzellen einen wichtigen Einfluss auf die Zellproliferation und das Zellüberleben hat. Sowohl bei Zellen aus Zelllinien, unter anderem auch bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinie Mino, als auch bei Zellen aus Patientenproben konnte durch selektives Hemmen von NF- κ B sowohl ein Zellzyklusarrest in der G₁-Phase als auch eine gesteigerte Apoptoserate erreicht werden. Weiterhin zeigte sich eine Reduktion in der Expression von Cyclin D1, was im Einklang mit der vorbeschriebenen Tatsache steht, dass *CCND1* ein Zielgen von NF- κ B darstellt. (Hinz et al., 1999) (Pham et al., 2003) NF- κ B ist als ein Transkriptionsfaktor bekannt, welcher BTK und Akt, und somit auch PI3K, nachgeschaltet ist. (Dal Porto et al., 2004) Hierzu passen Ergebnisse, die bei Untersuchungen an Zelllinien des aktivierte B-Zellen (ABC)-Typs des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms gewonnen wurden. Erdmann et al. zeigte, dass auch in einigen ABC-DLBCL-Zelllinien nicht durch selektive Hemmung der PI3K δ -Untereinheit, aber kombiniert der

5 Diskussion

PI3K δ - und - α -Untereinheit mittels des Inhibitors AZD8835, eine Apoptoseinduktion und Proliferationshemmung erzielt und eine Herunterregulation von einigen NF- κ B-Zielgenen wie *JUNB*, *NFKBIA*, *NFKBIE* und *TNF* beobachtet werden kann. Einige ABC-DLBCL-Zelllinien zeigten sich jedoch auch resistent gegenüber einer Inhibition von PI3K α und - δ oder auch BTK. Die Resistenz der Zelllinie OCI-Ly3 wurde dabei in Zusammenhang mit einer Mutation des CARD11-Proteins gebracht, welche zu einer unabhängigen NF- κ B-Aktivierung führt. Mit cDNA des mutierten CARD11 transduzierte Zellen der auf AZD8835 sensiblen ABC-DLBCL-Zelllinien entwickelten ebenfalls die beschriebene Resistenz. (Erdmann et al., 2017) Interessanterweise konnten Paul et al. jedoch zeigen, dass Copanlisib im Gegensatz zu AZD8835 auch in OCI-Ly3 eine Proliferationshemmung hervorruft, wobei weitere Daten auf eine zusätzliche, dem CARD11 nachgeschaltete, NF- κ B-Inhibition durch Copanlisib hinweisen. (Paul et al., 2017) In diesem Zusammenhang könnte die Überlegenheit von Copanlisib im Vergleich zu einer Kombinationstherapie mit Idelalisib und A66 bei Zelllinien des Mantelzelllymphoms auch mit einer zusätzlichen Hemmung des NF- κ B-Signalwegs zusammenhängen. Mögliches Ziel weiterer Arbeiten könnte hier die Detektion entsprechender Copanlisib-Zielproteine des Signalwegs sein.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der erwähnten Arbeit von Paul et al. ist die Tatsache, dass eine PI3K α - und - δ -Inhibition durch Copanlisib in ABC-DLBCL-Zelllinien eine Hochregulation des BTK-Signalwegs nach sich zog. Bei kombinierter Behandlung mit Copanlisib und dem BTK-Inhibitor Ibrutinib zeigten einige der untersuchten Zelllinien erwartbare Synergieeffekte bezüglich der IC₅₀- und IC₉₀-Werte sowie ein schnelleres Ansprechen, eine höhere Ansprechrate und einen längeren Zeitraum bis zum Rezidiv in Xenograft-Modellen. Auf der anderen Seite trat jedoch, wie auch bei OCI-Ly3 festgestellt, ein synergistischer Effekt nicht immer ein. Bei letztgenannter Zelllinie, welche auf eine Ibrutinib-Monotherapie nicht sensibel ist, wurde mit der beschriebenen Kombinationstherapie sogar ein antagonistischer Effekt beobachtet, welcher auf eine Hochregulation von p-ERK zurückgeführt werden kann. Hierzu passend führte in diesem Fall eine Kombinationstherapie mit Copanlisib und dem MEK-Inhibitor Refametinib zu Synergieeffekten. (Paul et al., 2017) Bezieht man diese Ergebnisse auf weitere klinische Anwendungen beim Mantelzelllymphom, kann möglicherweise bei Ibrutinib-sensiblen Mantelzelllymphomen durch eine Kombinationstherapie von Copanlisib und Ibrutinib ebenfalls ein schnelleres Ansprechen und eine höhere Ansprechrate sowie ein längerer Zeitraum bis zu einem Rezidiv erreicht werden.

5 Diskussion

Sollten, wie beim ABC-Typ des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms, sowohl MCL-Fälle mit synergistischem oder additivem Effekt als auch Fälle mit antagonistischem Effekt unter Kombinationstherapien beobachtet werden, wäre der nächstlogische Schritt die Suche nach genetischen prädiktiven Markern. Eine besondere Rolle könnten dabei die diskutierten hochregulierten Signalwegen und deren selektive Inhibition spielen.

Auf der Suche nach weiteren Wirkstoffen, welche sinnvoll in Kombination mit Copanlisib eingesetzt werden könnten, zeigten in einer Arbeit von Tarantelli et al. sowohl der BCL2-Inhibitor Venetoclax als auch der CDK4/6-Inhibitor Palbociclib häufig synergistische Effekte in der Reduktion stoffwechselaktiver Zellen, auch bei den meisten der getesteten MCL-Zelllinien, darunter Granta-519 und Jeko-1. Die Effektivität der Kombination von Copanlisib und Palbociclib wurde dabei auch auf einen erhöhten G₀/G₁-Arrest sowie eine Hochregulation der Expression des PI3K-inhibierenden Proteins PIK3IP1 zurückgeführt. Eine Analyse dieser Faktoren bei der Zelllinie Jeko-1 zeigte, dass ein ähnlich hoher Zellzyklusarrest auch bei einer Monotherapie mit Palbociclib erreicht werden kann, während die Expression des PIK3IP1 bei der Kombinationstherapie höher als bei einer jeweiligen Monotherapie ausfiel. (Zhu et al., 2007) (Tarantelli et al., 2020)

Auf einen synergistischen Effekt durch die Kombination von Copanlisib und Venetoclax deuteten bereits vorangegangene Arbeiten hin. Pham et al. zeigte, dass neben den meisten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersuchten MCL-Zelllinien auch verschiedene Primärzellproben bereits auf eine Monotherapie mit Venetoclax sensibel reagierten, wobei häufig eine Korrelation zwischen der Höhe der BCL-2-Expression und der Venetoclax-Sensibilität gefunden wurde. In einigen untersuchten Zelllinien, darunter auch Mino, induzierte die Therapie mit Venetoclax jedoch eine verstärkte Proteinexpression von p-Akt und p-MAPK. Das entsprechende Entgegenwirken durch Copanlisib kann dabei eine Ursache für die bereits beschriebenen Synergieeffekte bei einer Kombinationstherapie sein. (Pham et al., 2018) Tarantelli et al. konnte, ebenfalls an MCL-Patientenproben, eine apoptoseinduzierende Wirkung durch Venetoclax zeigen, die sich in Kombination mit Copanlisib teils deutlich steigern ließ. In diesem Zusammenhang wurden auch in jener Arbeit Auswirkungen auf die Proteinexpression untersucht. Dabei zeigte sich bei der Zelllinie Jeko-1 für das antiapoptotische Protein MCL1, welches als Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie an der Steuerung des intrinsischen Apoptosewegs beteiligt ist, ein ähnliches Bild, wie zuvor bereits für p-Akt

5 Diskussion

und p-MAPK. Copanlisib verringerte in Monotherapie die Expression von MCL1 und konnte in Kombinationstherapie der unter Monotherapie mit Venetoclax induzierten Erhöhung der MCL1-Expression entgegenwirken. (Montero et al., 2018) (Tarantelli et al., 2020)

Anzumerken bleibt jedoch, dass sowohl bei der beschriebenen Kombinationstherapie mit Palbociclib als auch bei jener mit Venetoclax bei manchen MCL-Zelllinien additive oder antagonistische Effekte auftraten. (Tarantelli et al., 2020)

Bojarczuk et al. zeigte auch bei DLBCL-Zelllinien, dass eine Kombination der Inhibitoren Copanlisib und Venetoclax sowohl zu synergistischen als auch zu antagonistischen Effekten führen kann, wobei sich genetische prädiktive Marker abzeichnen, welche auf ein synergistisches Wirken hindeuten. Auch der Einfluss von Copanlisib auf MCL1 und weitere am intrinsischen Apoptoseweg beteiligte Proteine wurde genauer untersucht, wobei sich je nach Zelllinie teils sehr unterschiedliche Einflüsse zeigten, welche in einigen Fällen mit bestimmten genetischen Variationen in Verbindung gebracht werden können. (Bojarczuk et al., 2019)

Auch hier könnte, jeweils in Bezug auf das Mantelzelllymphom, die Suche nach prädiktiven Faktoren, welche für oder gegen einen Einsatz von Palbociclib oder Venetoclax in Kombinationstherapien mit Copanlisib sprechen, ebenso ein erstrebenswertes Ziel weiterer Forschungsarbeiten darstellen wie auch die weitere Analyse Copanlisib-abhängiger Proteinexpressionsänderungen im Bereich der Bcl-2-Proteinfamilie.

5.4 Copanlisib in klinischen Studien

In einer Phase I-Studie (NCT00962611) wurde bezüglich Copanlisib zunächst die maximal tolerierbare Dosis (MTD) sowie auftretende Nebenwirkungen und das Anschlagen bei verschiedenen Krebserkrankungen, darunter auch Non-Hodgkin-Lymphome, untersucht. Das Therapieschema sah dabei vor, in einem 28-tägigen Zyklus jeweils an den Tagen 1, 8 und 15 Copanlisib intravenös zu verabreichen. Die Therapie wurde dabei bei einer maximal tolerierbaren Dosis von 0,8 mg/kg generell gut vertragen. Als häufigste Nebenwirkungen traten Hyperglykämien (63 %), Übelkeit (37 %) und Bluthochdruck (21 %) auf. Von neun Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen, welche allesamt vortherapiert waren, zeigte sich in dieser Studie bei den Patienten mit folliculärem Lymphom eine komplette Remission sowie fünf partielle Remissionen. Bei den Patienten mit diffusem großzelligem B-Zell-Lymphom zeigte

5 Diskussion

sich eine partielle Remission sowie zwei progrediente Erkrankungen. (Patnaik et al., 2016)

Eine Phase II-Studie (NCT01660451) wurde schließlich in zwei Teilen durchgeführt. In einen ersten Teil wurden dabei 84 Patienten mit teils indolenten Lymphomen, teils aggressiven Lymphomen eingeschlossen, welche auf mindestens zwei vorangegangene Therapieformen nicht angesprochen hatten oder nach diesen ein Rezidiv gezeigt hatten. Als Therapieschema wurde der Zyklus der vorbeschriebenen Phase I-Studie verwendet. Die Startdosierung betrug 0,8 mg/kg, konnte jedoch bei signifikanter Toxizität auf 0,6 und weiter auf 0,4 mg/kg reduziert werden. Von besonderem Interesse in Bezug auf die vorliegende Arbeit ist dabei die Betrachtung der 11 an der Studie teilgenommenen Patienten mit Mantelzelllymphomen. Beobachtet werden konnten davon 2 komplette Remissionen sowie 5 partielle Remissionen, was einer Gesamtansprechrates von ca. 64 % entspricht. Zum Vergleich konnte über die gesamte Kohorte der indolenten Lymphome ein Ansprechen von ca. 44 % und in aggressiven Lymphomen eine Rate von nur ca. 27 % nachgewiesen werden. (Dreyling et al., 2017a)

In den zweiten Teil der Studie wurden 142 Patienten mit indolenten B-Zell-Lymphomen eingeschlossen, wobei die mit Abstand höchste Fallzahl (104 Patienten) auf die folliculären Lymphome entfiel. Auch in diesen Teil der Studie wurden nur Patienten nach mindestens zwei vorangegangenen Therapieformen eingeschlossen. Es wurde erneut der beschriebene Therapiezyklus gewählt, die Dosierung von Copanlisib jedoch auf 60 mg pro Gabe vereinheitlicht. Bei Patienten mit folliculärem Lymphom betrug die Ansprechrates 59 % mit einer mittleren Dauer des Ansprechens von 12,2 Monaten. (Dreyling et al., 2017b) (Dreyling et al., 2019)

In der beschriebenen Phase II-Studie konnte innerhalb der Kohorten der indolenten Lymphome und der folliculären Lymphome mittels Genexpressionsanalyse ein Zusammenhang zwischen einem hochregulierten PI3K-/B-Zell-Rezeptor-Signalweg und dem Ansprechen auf Copanlisib gefunden werden. Ein ähnlicher Zusammenhang bei Mantelzelllymphomen wurde aufgrund der sehr geringen Fallzahl nicht beobachtet. (Dreyling et al., 2017a) (Dreyling et al., 2017b)

Die bereits bei der beschriebenen Phase I-Studie erwähnten häufigen Nebenwirkungen wurden ebenfalls in der Phase II-Studie beobachtet und waren kontrollierbar. Betrachtet man die Ergebnisse einer Folgeauswertung des zuletzt erwähnten Teils der beschriebenen Phase II-Studie ca. zwei Jahre nach der ersten

5 Diskussion

Auswertung, so bestätigte sich neben dem Gesamtansprechen auch die gute Verträglichkeit der Therapie über den längeren Betrachtungszeitraum. Im Allgemeinen traten die bekannten Nebenwirkungen bei einem Therapiezeitraum von über einem Jahr weder verstärkt auf, noch kamen neue Nebenwirkungen hinzu. (Dreyling et al., 2019)

Insgesamt kann das Risiko-Nutzen-Profil von Copanlisib, auch im Vergleich zum klinisch getesteten PI3K-Inhibitor Idelalisib, bisher als günstig bewertet werden. Auch wenn ein Vergleich zu letzterem bei jeweils geringen Fallzahlen mit Vorsicht betrachtet werden muss, fallen vor allem geringere gastrointestinale Nebenwirkungen, besonders des Anstiegs der Transaminasen ASAT und ALAT, sowie ein höheres Gesamtansprechen bei Patienten mit Mantelzelllymphomen (ca. 64 % gegenüber 40 %) auf. (Gopal et al., 2014) (Kahl et al., 2014) (Dreyling et al., 2017a) (Dreyling et al., 2019)

Der zweite Teil der erwähnten Phase II-Studie führte unter anderem zur Zulassung von Copanlisib in den USA zur Therapie erwachsener Patienten mit rezidiviertem follikulärem Lymphom und mindestens zwei vorangegangenen systemischen Therapien. Der Wirkstoff durchlief dabei ein beschleunigtes Zulassungsverfahren aufgrund der bisherigen aussichtsreichen klinischen Ergebnisse, welche jedoch bei dieser Art des Verfahrens auch nach der aktuellen Zulassung durch zukünftige Studien bestätigt werden müssen. (Information aus dem Drug Trials Snapshot: Aliqopa® der U. S. Food and Drug Administration)

Die Phase III-Studien NCT02367040 und NCT02626455, welche verschiedene Kombinationstherapien mit Copanlisib untersuchen und höhere Fallzahlen aufweisen, wurden bereits begonnen.

Ergänzend zu dem in der vorliegenden Arbeit gezeigten sehr guten in vitro-Ansprechen von Mantelzelllymphomen auf Copanlisib weisen die klinischen Studien aufgrund der guten klinischen Verträglichkeit und hohen Ansprechraten auch bei Mantelzelllymphomen, wenn auch in einer sehr geringen Fallzahl, auf die Wirksamkeit von Copanlisib auch für diese Patientengruppe hin. Die Untersuchung größerer Fallzahlen auch beim Mantelzelllymphom könnte in Abhängigkeit von den Ergebnissen möglicherweise auch zu einer Zulassung in diesem Lymphomtyp führen.

6 Zusammenfassung

Die Therapie des Mantelzelllymphoms gestaltet sich, vor allem im Rezidiv, auch nach Jahren der Forschung weiterhin als schwierig. Vor diesem Hintergrund werden neue Behandlungsmethoden dringend gesucht. Die Inhibition des PI3K-Signalwegs stellt dazu nach heutigem molekularem Verständnis einen vielversprechenden Ansatz dar. Nachdem der Inhibitor Idelalisib, welcher selektiv die δ -Untereinheit der PI3K inhibiert, in den ersten klinischen Anwendungen nur eine kurze Remissionsdauer erzielte, wurde in der vorliegenden Arbeit der neue PI3K α - und - δ -Inhibitor Copanlisib untersucht. Dieser zeigte bereits in anderen Tumorentitäten vielversprechende Ergebnisse. Analysiert wurde nun sowohl die Effektivität als auch der Wirkmechanismus und jeweils verglichen mit anderen PI3K-Inhibitoren.

Alle 6 der getesteten Zelllinien zeigten sich in einem Zeitraum von 72 Stunden sensibel gegenüber Copanlisib. Während sich die $IC_{50}(72 \text{ Stunden})$ -Werte bei 4 dieser Zelllinien um weniger als den Faktor 2 unterschieden, wichen die Werte der sensibelsten und der resistentesten Zelllinie um je eine Größenordnung von denen der anderen Zelllinien ab. Ein Zusammenhang mit genetischen Veränderungen als Ursache für die hier festgestellte besondere Sensibilität konnte nicht gefunden werden. Verglichen mit allen weiteren in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren reagierten die Mantelzelllymphomzelllinien gegenüber Copanlisib am empfindlichsten. Dass die Wirkung der PI3K-Inhibitoren dabei nicht spezifisch für Zelllinien des Mantelzelllymphoms ist, konnte auch noch einmal anhand der Kontrollzelllinie Jurkat (T-ALL) gezeigt werden.

Bereits bei einer Konzentration von 0,625 μM löste Copanlisib in den untersuchten Zellen einen deutlichen G_1 -Arrest aus, welcher je nach Sensibilität der Zelllinie unterschiedlich stark ausfiel und bei höheren Konzentrationen weiter zunahm.

Eine apoptotische Wirkung konnte bei 0,625 μM kaum, bei höheren Konzentrationen jedoch deutlich nachgewiesen werden. Auch hier unterschied sich das Ausmaß je nach Sensibilität der Zelllinie.

Im Gegensatz zu anderen getesteten Inhibitorkombinationen zeigte sich, dass Idelalisib und der PI3K α -Inhibitor A66 synergistische Effekte erzielen, was zu aktuellen Forschungsergebnissen bezüglich der Expression von PI3K-Untereinheiten in Mantelzelllymphomen, insbesondere bei rezidivierter oder refraktärer MCL-Erkrankung, passt.

6 Zusammenfassung

Anhand von durchgeführten Western Blot-Analysen der PI3K nachgeschalteten Signalwege und aktueller Forschungsliteratur konnten unter anderem auch Hinweise zur Erklärung der überlegenen Wirkung von Copanlisib gegenüber der Kombination von Idelalisib und A66 gewonnen werden.

Analysen von Patientenproben legen den Schluss nahe, dass Copanlisib eine deutlich stärkerer Wirkung als Idelalisib zeigt.

Erste klinische Studien mit Copanlisib weisen auf ein gutes Nebenwirkungsprofil hin, zeigten in geringen Fallzahlen erste in vivo-Therapieerfolge bei MCL-Patienten und führten bereits zur Zulassung des Wirkstoffs in den USA für die Therapie follikulärer Lymphome.

Abschließend kann Copanlisib als aussichtsreicher Wirkstoff für eine zukünftige Behandlung von Patienten mit Mantelzelllymphomen gesehen werden. Für eine genauere Einschätzung sind jedoch noch Studien mit größeren Fallzahlen notwendig. Auch gibt es Hinweise auf Synergismen bei Kombinationstherapien mit Copanlisib. Aktuelle Studien untersuchen solche kombinierten Therapieansätze auch beim Mantelzelllymphom.

7 Abkürzungsverzeichnis

ABC:	Aktivierte B-Zelle (activated B-cell)
4E-BP:	eIF4E Binding Protein
7-AAD:	7-aminoactinomycin D
AFX:	FOXO4 (Forkhead-Box-Protein O4) (vorher <i>AFX</i> für acute-lymphocytic-leukaemia-1 fused gene from chromosome X)
Akt:	Proteinkinase B (<i>AKT</i> in der Genbezeichnung <i>AKT1-3</i> gebildet aus v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1-3; akt dabei gebildet aus Mauslinie Ak und thymoma)
ALAT:	Alanin-Aminotransferase
AP-1:	Activator protein 1
APS:	Ammoniumpersulfat
ASAT:	Aspartat-Aminotransferase
ATM/ <i>ATM</i> :	Serin-Proteinkinase ATM (ataxia telangiectasia mutated), sowie deren Genbezeichnung
ATP:	Adenosintriphosphat
BAD:	bcl-2 (B-cell lymphoma 2)-associated death promotor
BCL-2:	B-cell lymphoma 2 (Protein)
BTK:	Bruton-Tyrosinkinase
<i>CCND1</i> :	Genbezeichnung des Cyclin D1
CD:	Unterscheidungsgruppen (cluster of differentiation)
CD95L:	CD95 Ligand
CDK:	Cyclin abhängige Kinase (cyclin-dependent kinase)
c-Fos:	Cellular Fos (Protein) (nach der Genbezeichnung <i>fos</i>)
CHOP:	Cyclophosphamid + Doxorubicin + Vincristin + Prednison
c-Jun:	Cellular Jun (Protein) (nach der Genbezeichnung <i>jun</i>)
CLL:	Chronisch lymphatische Leukämie
DLBCL:	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (diffuse large B-cell lymphoma)
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DPBS:	Dulbecco's phosphate-buffered saline
ECL:	Elektrochemilumineszenz
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
ERK1/2:	Extracellular signal-regulated kinases 1/2

7 Abkürzungsverzeichnis

eIF4A:	Eukaryotic initiation factor 4A
eIF4B:	Eukaryotic initiation factor 4B
eIF4E:	Eukaryotic initiation factor 4E
eIF4F:	Eukaryotic initiation factor 4F
ELISA:	Enzyme linked immunosorbent assay
FA:	Fraction affected
FBXO4:	F-box only protein 4
FISH:	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FKHRL1:	FOXO3 (Forkhead-Box-Protein O3) (vorher FKHRL1 für forkhead in thabdomyosarcoma like 1)
FMC:	Flinders Medical Centre
G ₀ (-Phase):	G ₀ -Phase des Zellzyklus (G für gap)
G ₁ (-Phase):	G ₁ -Phase des Zellzyklus (G für gap)
G ₂ (-Phase):	G ₂ -Phase des Zellzyklus (G für gap)
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCB:	B-Zelle des Keimzentrums (germinal center B-cell)
G-NET:	Gelatine + NET
GSK3:	Glykogensynthase-Kinase 3
HRP:	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IC ₅₀ :	Mittlere Inhibitorische Konzentration (half maximal inhibitory concentration)
IgH:	Schwere Immunglobulinkette (immunoglobulin heavy chain)
IGHV//IGHV:	Variable Regionen der schweren Immunglobulinkette (immunoglobulin heavy chain variable region), sowie deren Genbezeichnung
IRS1:	Insulinrezeptorsubstrat 1
<i>JUNB</i> :	Genbezeichnung des transcription factor jun-B
LDH:	Lactatdehydrogenase
M(-Phase):	Mitose-Phase des Zellzyklus
MAP:	Mitogen-activated protein
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
MCL:	Mantelzelllymphom (mantle cell lymphoma)
MCL1:	Myeloid cell leukemia 1 (Protein)
MEK1/2:	Mitogen-activated protein kinase kinases 1/2 (MAPK/ERK kinases 1/2)
MEK3/6:	Mitogen-activated protein kinase kinases 3/6 (MAPK/ERK kinases 3/6)

7 Abkürzungsverzeichnis

MK2/3:	MAPK-activated protein kinases 2/3
MNK1:	MAPK-interacting kinase 1
MNK2:	MAPK-interacting kinase 2
mRNA:	Messenger RNA
MSK1/2:	Mitogen- and stress-activated kinases 1/2
MTD:	Maximal tolerierbare Dosis
MTS:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
mTOR:	Mechanistic (vorher: mammalian) target of rapamycin
mTORC1:	mTOR complex 1
mTORC2:	mTOR complex 2
NET:	NaCl + EDTA + TRIS-HCl + Triton X-100
NF- κ B:	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<i>NFKBIA</i> :	Genbezeichnung des nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
<i>NFKBIE</i> :	Genbezeichnung des nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon
NK-Zelle:	Natürliche Killerzelle
<i>NOTCH1</i> :	Genbezeichnung des Notch-Rezeptor 1 (neurogenic locus notch homolog protein 1)
<i>NOTCH2</i> :	Genbezeichnung von Notch-Rezeptor 2 (neurogenic locus notch homolog protein 2)
p38 MAPK:	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PDF:	Portable Document Format
PDK:	Phosphoinositide-dependent kinase
PE:	Phycoerythrin
PI:	Propidiumiodid
PI(3,4,5)P ₃ :	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PI(4,5)P ₂ :	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIM:	Serin/Threonin-Proteinkinase Pim (proviral integrations of Moloney virus)
PI3K:	Phosphoinositid-3-Kinasen
<i>PIK3CA</i> :	Genbezeichnung der PI3K p110- α
<i>PIK3CB</i> :	Genbezeichnung der PI3K p110- β
<i>PIK3CD</i> :	Genbezeichnung der PI3K p110- δ

7 Abkürzungsverzeichnis

<i>PIK3CG</i> :	Genbezeichnung der PI3K p110- γ
PIK3IP1:	PI3K interacting protein 1
PTEN:	Phosphatase and tensin homologue
PVDF:	Polyvinylidenfluorid
Raptor:	Regulatory associated protein of mTOR
R-CHOP:	Rituximab + Cyclophosphamid + Doxorubicin (Hydroxydaunorubicin) + Vincristin (Oncovin [®]) + Prednison
Raf:	Raf Kinasen (rapidly accelerated fibrosarcoma)
Ras:	Ras Proteine (rat sarcoma)
Rictor:	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNA:	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase:	Ribonuklease
RPM:	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
RSK:	p90 ribosomal protein S6 kinase
RTK:	Rezeptor-Tyrosinkinase
S(-Phase):	Synthese-Phase des Zellzyklus
S6K:	p70 ribosomal protein S6 kinase
SDS:	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SOX11/ SOX11:	SOX11 Transkriptionsfaktor (SRY (sex-determining region Y)-related HMG (high mobility group) box 11) und dessen Genbezeichnung
T-ALL:	T-Zell-Akute lymphatische Leukämie
TBS:	TRIS-buffered saline
TBST:	TBS + Tween 20
TEMED:	Tetramethylethylendiamin
<i>TNF</i> :	Genbezeichnung des tumor necrosis factor
<i>TP53</i> :	Genbezeichnung des Protein p53 (tumor protein p53)
TRIS:	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC2:	Tuberous sclerosis complex 2
WNT:	Abkürzung gebildet aus Wingless und Int (integration)-1
WST:	Water soluble tetrazolium

8 Literaturverzeichnis

- Ali, A., Hoeflich, K. P. & Woodgett, J. R. (2001). Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem Rev*, 101(8), 2527-2540.
- Argatoff, L. H., Connors, J. M., Klasa, R. J. et al. (1997). Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*, 89(6), 2067-2078.
- Banks, P. M., Chan, J., Cleary, M. L. et al. (1992). Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am J Surg Pathol*, 16(7), 637-640.
- Bea, S., Valdes-Mas, R., Navarro, A. et al. (2013). Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(45), 18250-18255.
- Belaud-Rotureau, M. A., Parrens, M., Dubus, P. et al. (2002). A comparative analysis of FISH, RT-PCR, PCR, and immunohistochemistry for the diagnosis of mantle cell lymphomas. *Mod Pathol*, 15(5), 517-525.
- Bodrug, S. E., Warner, B. J., Bath, M. L. et al. (1994). Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *EMBO J*, 13(9), 2124-2130.
- Bojarczuk, K., Wienand, K., Ryan, J. A. et al. (2019). Targeted inhibition of PI3Kalpha/delta is synergistic with BCL-2 blockade in genetically defined subtypes of DLBCL. *Blood*, 133(1), 70-80.
- Cargnello, M. & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75(1), 50-83.
- Carriere, A., Romeo, Y., Acosta-Jaquez, H. A. et al. (2011). ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem*, 286(1), 567-577.
- Carvajal-Cuenca, A., Sua, L. F., Silva, N. M. et al. (2012). In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. *Haematologica*, 97(2), 270-278.
- Castellano, E. & Downward, J. (2011). RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer*, 2(3), 261-274.
- Cortelazzo, S., Ponzoni, M., Ferreri, A. J. et al. (2012). Mantle cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, 82(1), 78-101.
- Dal Porto, J. M., Gauld, S. B., Merrell, K. T. et al. (2004). B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol*, 41(6-7), 599-613.
- Drexler, H. G. & MacLeod, R. A. (2002). Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of mantle cell lymphoma. *Leuk Res*, 26(9), 781-787.

8 Literaturverzeichnis

- Dreyling, M., Ferrero, S. & Hermine, O. (2014). How to manage mantle cell lymphoma. *Leukemia*, 28(11), 2117-2130.
- Dreyling, M., Morschhauser, F., Bouabdallah, K. et al. (2017a). Phase II study of copanlisib, a PI3K inhibitor, in relapsed or refractory, indolent or aggressive lymphoma. *Ann Oncol*, 28(9), 2169-2178.
- Dreyling, M., Santoro, A., Mollica, L. et al. (2019). Long-term safety and efficacy of the PI3K inhibitor copanlisib in patients with relapsed or refractory indolent lymphoma: 2-year follow-up of the CHRONOS-1 study. *Am J Hematol*.
- Dreyling, M., Santoro, A., Mollica, L. et al. (2017b). Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition by Copanlisib in Relapsed or Refractory Indolent Lymphoma. *J Clin Oncol*, 35(35), 3898-3905.
- Erdmann, T., Klener, P., Lynch, J. T. et al. (2017). Sensitivity to PI3K and AKT inhibitors is mediated by divergent molecular mechanisms in subtypes of DLBCL. *Blood*, 130(3), 310-322.
- Erikson, J., Finan, J., Tsujimoto, Y. et al. (1984). The chromosome 14 breakpoint in neoplastic B cells with the t(11;14) translocation involves the immunoglobulin heavy chain locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(13), 4144-4148.
- Estrov, Z., Talpaz, M., Ku, S. et al. (1998). Z-138: a new mature B-cell acute lymphoblastic leukemia cell line from a patient with transformed chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*, 22(4), 341-353.
- Feldman, M. E., Apse, B., Uotila, A. et al. (2009). Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol*, 7(2), e38.
- Fingar, D. C., Richardson, C. J., Tee, A. R. et al. (2004). mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol*, 24(1), 200-216.
- Fogli, L. K., Williams, M. E., Connors, J. M. et al. (2015). Development and characterization of a Mantle Cell Lymphoma Cell Bank in the American Type Culture Collection. *Leuk Lymphoma*, 56(7), 2114-2122.
- Fu, K., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C. et al. (2005). Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*, 106(13), 4315-4321.
- Gao, J., Peterson, L., Nelson, B. et al. (2009). Immunophenotypic variations in mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*, 132(5), 699-706.
- Gerard-Marchant, R., Hamlin, I., Lennert, K. et al. (1974). Letter: Classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet*, 2(7877), 405-408.
- Gopal, A. K., Kahl, B. S., de Vos, S. et al. (2014). PI3Kdelta inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *N Engl J Med*, 370(11), 1008-1018.

8 Literaturverzeichnis

- Goy, A. & Kahl, B. (2011). Mantle cell lymphoma: the promise of new treatment options. *Crit Rev Oncol Hematol*, 80(1), 69-86.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Stein, H. et al. (1994). A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 84(5), 1361-1392.
- Hay, N. (2010). Mnk earmarks eIF4E for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(32), 13975-13976.
- Heesom, K. J., Gampel, A., Mellor, H. et al. (2001). Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1). *Curr Biol*, 11(17), 1374-1379.
- Herrmann, A., Hoster, E., Zwingers, T. et al. (2009). Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 27(4), 511-518.
- Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A. et al. (1999). NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol*, 19(4), 2690-2698.
- Huang, D., Song, T. L., Nairismagi, M. L. et al. (2020). Evaluation of the PI3K pathway in peripheral T-cell lymphoma and NK/T-cell lymphoma. *Br J Haematol*.
- Igney, F. H. & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2(4), 277-288.
- Iyengar, S., Clear, A., Bodor, C. et al. (2013). P110alpha-mediated constitutive PI3K signaling limits the efficacy of p110delta-selective inhibition in mantle cell lymphoma, particularly with multiple relapse. *Blood*, 121(12), 2274-2284.
- Jackson, S. P., Schoenwaelder, S. M., Goncalves, I. et al. (2005). PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy. *Nat Med*, 11(5), 507-514.
- Jamieson, S., Flanagan, J. U., Kolekar, S. et al. (2011). A drug targeting only p110alpha can block phosphoinositide 3-kinase signalling and tumour growth in certain cell types. *Biochem J*, 438(1), 53-62.
- Jirawatnotai, S., Hu, Y., Michowski, W. et al. (2011). A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers. *Nature*, 474(7350), 230-234.
- Kahl, B. S., Spurgeon, S. E., Furman, R. R. et al. (2014). A phase 1 study of the PI3Kdelta inhibitor idelalisib in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma (MCL). *Blood*, 123(22), 3398-3405.
- Khouri, I. F., Lee, M. S., Saliba, R. M. et al. (2003). Nonablative allogeneic stem-cell transplantation for advanced/recurrent mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 21(23), 4407-4412.

8 Literaturverzeichnis

- Komatsu, H., Iida, S., Yamamoto, K. et al. (1994). A variant chromosome translocation at 11q13 identifying PRAD1/cyclin D1 as the BCL-1 gene. *Blood*, 84(4), 1226-1231.
- Konicek, B. W., Dumstorf, C. A. & Graff, J. R. (2008). Targeting the eIF4F translation initiation complex for cancer therapy. *Cell Cycle*, 7(16), 2466-2471.
- Lannutti, B. J., Meadows, S. A., Herman, S. E. 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.
- Lecluse, Y., Lebailly, P., Roulland, S. et al. (2009). t(11;14)-positive clones can persist over a long period of time in the peripheral blood of healthy individuals. *Leukemia*, 23(6), 1190-1193.
- Lenz, G., Dreyling, M., Hoster, E. 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). *J Clin Oncol*, 23(9), 1984-1992.
- Lenz, G., Hawkes, E., Verhoef, G. et al. (2020). Single-agent activity of phosphatidylinositol 3-kinase inhibition with copanlisib in patients with molecularly defined relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*.
- Liu, N., Rowley, B. R., Bull, C. O. et al. (2013). BAY 80-6946 is a highly selective intravenous PI3K inhibitor with potent p110alpha and p110delta activities in tumor cell lines and xenograft models. *Mol Cancer Ther*, 12(11), 2319-2330.
- Magnuson, B., Ekim, B. & Fingar, D. C. (2012). Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J*, 441(1), 1-21.
- Martin, P., Chadburn, A., Christos, P. et al. (2009). Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 27(8), 1209-1213.
- Montero, J. & Letai, A. (2018). Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? *Cell Death Differ*, 25(1), 56-64.
- Mothe-Satney, I., Brunn, G. J., McMahon, L. P. et al. (2000). Mammalian target of rapamycin-dependent phosphorylation of PHAS-I in four (S/T)P sites detected by phospho-specific antibodies. *J Biol Chem*, 275(43), 33836-33843.
- Musgrove, E. A., Caldon, C. E., Barraclough, J. et al. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer*, 11(8), 558-572.
- Navarro, A., Clot, G., Royo, C. et al. (2012). Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Res*, 72(20), 5307-5316.

8 Literaturverzeichnis

- Nawijn, M. C., Alendar, A. & Berns, A. (2011). For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 11(1), 23-34.
- Norton, A. J., Matthews, J., Pappa, V. et al. (1995). Mantle cell lymphoma: natural history defined in a serially biopsied population over a 20-year period. *Ann Oncol*, 6(3), 249-256.
- Okkenhaug, K. (2013). Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. *Annu Rev Immunol*, 31, 675-704.
- Orchard, J., Garand, R., Davis, Z. 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.
- Patnaik, A., Appleman, L. J., Tolcher, A. 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. *Ann Oncol*, 27(10), 1928-1940.
- Paul, J., Soujon, M., Wengner, A. M. et al. (2017). Simultaneous Inhibition of PI3Kdelta and PI3Kalpha Induces ABC-DLBCL Regression by Blocking BCR-Dependent and -Independent Activation of NF-kappaB and AKT. *Cancer Cell*, 31(1), 64-78.
- Pham, L. V., Huang, S., Zhang, H. et al. (2018). Strategic Therapeutic Targeting to Overcome Venetoclax Resistance in Aggressive B-cell Lymphomas. *Clin Cancer Res*, 24(16), 3967-3980.
- Pham, L. V., Tamayo, A. T., Yoshimura, L. C. et al. (2003). Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Immunol*, 171(1), 88-95.
- Raffeld, M. & Jaffe, E. S. (1991). bcl-1, t(11;14), and mantle cell-derived lymphomas. *Blood*, 78(2), 259-263.
- Rizzatti, E. G., Falcao, R. P., Panepucci, R. A. 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. *Br J Haematol*, 130(4), 516-526.
- Salaverria, I., Zettl, A., Bea, S. et al. (2007). Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J Clin Oncol*, 25(10), 1216-1222.
- Samaha, H., Dumontet, C., Ketterer, N. et al. (1998). Mantle cell lymphoma: a retrospective study of 121 cases. *Leukemia*, 12(8), 1281-1287.
- Sant, M., Allemani, C., Tereanu, C. et al. (2010). Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*, 116(19), 3724-3734.

8 Literaturverzeichnis

- Shakir, R., Ngo, N. & Naresh, K. N. (2008). Correlation of cyclin D1 transcript levels, transcript type and protein expression with proliferation and histology among mantle cell lymphoma. *J Clin Pathol*, 61(8), 920-927.
- Tabe, Y., Jin, L., Konopleva, M. et al. (2014). Class IA PI3K inhibition inhibits cell growth and proliferation in mantle cell lymphoma. *Acta Haematol*, 131(1), 59-69.
- Tarantelli, C., Lange, M., Gaudio, E. et al. (2020). Copanlisib synergizes with conventional and targeted agents including venetoclax in B- and T-cell lymphoma models. *Blood Adv*, 4(5), 819-829.
- The 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.
- Tiemann, M., Schrader, C., Klapper, W. 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. *Br J Haematol*, 131(1), 29-38.
- Vanhaesebroeck, B., Stephens, L. & Hawkins, P. (2012). PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(3), 195-203.
- Walker, C. L., Hunter, D. & Everitt, J. I. (2003). Uterine leiomyoma in the Eker rat: a unique model for important diseases of women. *Genes Chromosomes Cancer*, 38(4), 349-356.
- Webb, J. L. (1963). *Enzyme and metabolic inhibitors*. New York,: Academic Press.
- Weissinger, F., Kreipe, H. H. & Wilhelm, M. (1997). [Non-Hodgkin lymphomas]. *Internist (Berl)*, 38(11), 1131-1142.
- Will, M., Qin, A. C., Toy, W. et al. (2014). Rapid induction of apoptosis by PI3K inhibitors is dependent upon their transient inhibition of RAS-ERK signaling. *Cancer Discov*, 4(3), 334-347.
- Yang, Q., Chen, L. S., Neelapu, S. S. et al. (2012). Transcription and translation are primary targets of Pim kinase inhibitor SGI-1776 in mantle cell lymphoma. *Blood*, 120(17), 3491-3500.
- Yee, K. W., Zeng, Z., Konopleva, M. et al. (2006). Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*, 12(17), 5165-5173.
- Zhu, Z., He, X., Johnson, C. et al. (2007). PI3K is negatively regulated by PIK3IP1, a novel p110 interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 358(1), 66-72.
- Zucca, E., Roggero, E., Pinotti, G. et al. (1995). Patterns of survival in mantle cell lymphoma. *Ann Oncol*, 6(3), 257-262.

9 Bisherige Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht im Rahmen von:

- 1) Arnd J., Zoellner A.-K., Hutter G., Zimmermann Y., Hiddemann W., Dreyling M. (2014). Efficacy of the PI3K-inhibitor Copanlisib compared to selective PI3K- α , - β , - δ -inhibitors and combinations of them in therapy of mantle cell lymphoma (MCL). Sechzehntes wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Klinikum der Universität München, Campus Großhadern, Freising, Juli 2014.
- 2) Zoellner A.-K., Arnd J., Hutter G., Zimmermann Y., Hiddemann W., Dreyling M. (2014). Efficacy of PI3K-inhibitors in Mantle Cell Lymphoma (MCL). Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Hamburg, Oktober 2014. *Oncol Res Treat* 2014; 37(suppl 5) #P238.
- 3) A. Zoellner, J. Arnd, G. Hutter, Y. Zimmermann, W. Hiddemann, M. Dreyling (2015). Efficacy of the Pan PI3K-Inhibitor Copanlisib Compared to Selective PI3K-A, -B, - Δ Inhibitors in Mantle Cell Lymphoma (MCL). 20th Congress of the European Hematology Association, Vienna, June 2015. *Haematologica* 2015; 100(s1) #E1375.
- 4) Hutter G., Zimmermann Y., Zoellner A., Irrgang P., Arnd J., Hiddemann W., Dreyling M. (2015). Comparison of the efficiencies of different PI3K-Inhibitors in mantle cell lymphoma. Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Basel, Oktober 2015. *Oncol Res Treat* 2015; 38(suppl 5) #P221.

10 Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Martin Dreyling nicht nur für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Arbeit unter seiner Leitung durchführen zu können, sondern auch für die durchgehend freundliche, hilfsbereite und motivierende Art während der gesamten Zeit einen herzlichen Dank aussprechen.

Weiterhin bin ich Dr. med. Anna Zoellner für ihre intensive und kontinuierliche Betreuung, hilfreiches Feedback und viele Tipps äußerst dankbar. Ihre herzliche Art habe ich bei unserer gemeinsamen Arbeit sehr geschätzt.

Dr. rer. nat. Grit Hutter, Yvonne Zimmermann sowie vielen weiteren Mitarbeitern der Laborgemeinschaft bin ich für die Einarbeitung und Unterstützung bei den Laborarbeiten zu Dank verpflichtet. Von ihrer aller Erfahrung konnte ich sehr profitieren.

Nicht zuletzt gilt mein herzlichster Dank meinen lieben Eltern, die mir nicht nur das Medizinstudium ermöglicht, sondern mich auch während der gesamten Zeit bei dessen Bewältigung uneingeschränkt unterstützt haben.



Eidesstattliche Versicherung

Arnd, Jochen

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Molekular gezielte Therapien des Mantelzelllymphoms -
In-vitro-Wirksamkeit des Phosphoinositid-3-Kinasen-Inhibitors Copanlisib im Vergleich mit
selektiven PI3K α -, - β - und - δ -Inhibitoren**

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

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

München, 09.12.2022

Ort, Datum

Jochen Arnd

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand