

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt



Molekulare Therapie des Mantelzelllymphoms:

**Analyse der Wirkungsweise des dualen pan-PI3K und mTOR-Inhibitor, PQR309,
in Mono- und Kombinationstherapie beim Mantelzelllymphom anhand eines
Zelllinienmodells**

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

vorgelegt von
Rossana Kvint

aus
Denisowka, Kasachstan

Jahr
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Dreyling

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Georg Enders

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Grit Hutter

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2023

Inhaltsverzeichnis

1	EINFÜHRUNG	6
2	DAS MANTELZELL-LYMPHOM	6
2.1.1	Definition, Pathologie und molekulare Hintergründe	6
2.1.2	Epidemiologie, Klinik, Verlauf und Therapie	7
2.1.2.1	PI3K und mTOR-Signalwege	9
2.1.3	Gezielte molekulare Therapie durch pan-PI3K und mTOR Inhibitoren	12
2.1.3.1	Pan-PI3K und dualer mTOR Inhibitor: PQR309	12
2.1.3.2	PIM-1	13
2.1.4	Zellseneszenz	14
3	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	17
4	MATERIALIEN UND METHODEN	18
4.1	Materialien	18
4.1.1	Zellkulturmedien und Zusätze	18
4.1.2	Inhibitoren und Zytostatika	18
4.1.3	Verwendete Antikörper	19
4.1.4	Lösungen, Puffer und Reagenzien	20
4.1.5	Selbsthergestellte Puffer und Lösungen.....	22
4.1.6	SDS-Page Gele	23
4.1.7	Verwendete Software	23
4.1.8	Verwendete Geräte.....	23
4.1.9	Verbrauchsmaterialien.....	25
4.2	Methoden	26
4.2.1	Zellkultur	26
4.2.1.1	Zelllinien – Charakterisierung	26
4.2.1.2	Bedingungen in der Zellkultur	27
4.2.1.3	Einfrieren und Auftauen der Zelllinien	27
4.2.2	Zellzahlbestimmung mittels Vi-Cell.....	27
4.2.3	WST-1 Proliferationsassay	28
4.2.4	Durchflusszytometrie	28
4.2.4.1	Funktionsweise der Durchflusszytometrie	28
4.2.4.2	Analyse des Zellzyklus (Propidiumiodid-Färbung)	29
4.2.4.3	Analyse der Apoptose (Annexin V-PE und 7-AAD Färbung)	30
4.2.5	Western Blot und Proteinanalyse	30
4.2.6	Fraction of Product	31
4.2.7	Statistische Auswertungen	31
5	ERGEBNISSE	32

5.1	Viabilitäts- und Proliferationsassay.....	32
5.1.1	PQR309	32
5.1.2	Pan-PI3K-Inhibitor, mTORC1-Inhibitor, mTORC1/C2-Inhibitor sowie Kombinationsexperimente	34
5.1.3	PQR309 und verschiedene Kombinationspartner	39
5.1.4	PQR309 und PIM1-Kinase-Inhibitor	44
5.2	Zellzyklus- und Apoptoseanalyse von PQR309	46
5.2.1	Zellzyklusanalyse.....	47
5.2.2	Apoptose.....	49
5.3	Proteinexpression unter Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren	52
5.4	Seneszenzuntersuchung der Zelllinie Z-138	58
6	DISKUSSION	60
6.1	Viabilitäts- und Proliferationsassay.....	60
6.1.1	PQR309	60
6.1.2	Pan-PI3K-Inhibitor, mTORC1-Inhibitor und mTORC1/C2-Inhibitor sowie Kombinationsexperimente	61
6.1.3	PQR309 und verschiedene Kombinationspartner	63
6.1.4	PQR309 und PIM1-Kinase-Inhibitor	66
6.2	Zellzyklus- und Apoptoseanalyse von PQR309	66
6.2.1	Zellzyklusanalyse.....	66
6.2.2	Apoptose.....	67
6.3	Proteinexpression unter Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren	68
6.4	Seneszenzuntersuchung der Zelllinie Z-138	69
7	ZUSAMMENFASSUNG	71
8	LITERATURVERZEICHNIS	73
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	80
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	82
	TABELLENVERZEICHNIS	85
	DANKSAGUNG	87
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	88

1 Einführung

2 Das Mantelzell-Lymphom

2.1.1 Definition, Pathologie und molekulare Hintergründe

Mantelzelllymphom (MCL) gehört zur Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome. Es entwickelt sich aus einer neoplastisch transformierten reifen B-Zelle in der Mantelzone eines Lymphknotens. Immunhistochemisch weisen seine Zellen nicht nur Pan-B-Zell-Marker (CD19, CD20, CD22 und/oder CD79A), sondern auch CD5 und häufig CD43 sowie Cyclin-D1- und SOX11-Überexpressionen auf. Nach der Klassifikation der WHO aus dem Jahr 2017 unterscheidet man eine klassische und eine leukämische nicht-nodale Form des MCL (Swerdlow et al., 2017). Die früher MCL *in situ* genannte Neoplasie wurde inzwischen in *in-situ*-Mantelzell-Neoplasie umbenannt. Sie zählt als eigenständige Entität und bedarf keiner Therapie (Okamoto et al., 2020).

In dieser Arbeit wurde mit Zellen des klassischen MCL gearbeitet. Histologisch stellen sich monomorphe, klein bis mittelgroße lymphoide Zellen mit irregulär geformten Kernen und schmalen Zytoplasma dar, die in mehr als 98% der Fälle die Translokation t(11;14)(q13;q32) aufweisen (Swerdlow et al., 2017). Die Translokation findet dabei zwischen dem Immunglobulin-Schwerketten-Gen des Chromosoms 14 und dem Cyclin-D1-Gen des Chromosoms 11 statt (Cortelazzo et al., 2012). Eine Überexpression von Cyclin-D1-Protein und damit eine Dysregulation des Zellzyklus ist die Folge. Das RB-Tumorsuppressorgen wird dabei durch eine Komplexbildung aus Cyclin-D1, Cyclin-dependent Kinase (CDK) 4 und 6 inaktiviert, was den Übergang von der G1- in die S-Phase ermöglicht. Die alleinige Translokation reicht jedoch in der Regel nicht aus, um eine Manifestation des Lymphoms zu gewährleisten (Teo et al., 2016). Es werden meist zusätzlich neben einer oft vorkommenden Überexpression des SRY-related HMG-box (SOX)11-Proteins andere sekundäre chromosomale Mutationen in Genen wie Ataxia telangiectasia mutated (ATM), Tumor Protein (p) 53, Protein (p) 16, B-Cell Lymphoma (BCL) 2 nachgewiesen (Kodet et al., 2003; Swerdlow et al., 2017).

2.1.2 Epidemiologie, Klinik, Verlauf und Therapie

Etwa 6-9% der malignen Lymphome in Europa sind MCLs. Dabei sind Männer mit einem mittleren Erkrankungsalter von 65 Jahren dreimal häufiger betroffen als Frauen (Dreyling, M et al., 2017).

Obwohl das MCL formal der Klasse der niedrigmalignen Lymphome zugeordnet wird, zeigen bei der Erstdiagnose die Mehrzahl der Betroffenen bereits ein fortgeschrittenes Stadium mit disseminiertem Befallsmuster und systemischen Symptomen. In 75% der Fälle ist ein ausgedehnter Lymphknotenbefall zu sehen. Bei der Hälfte der Patienten kommt es zu einer massiven Spleno- und Hepatomegalie. Das Knochenmark und der Gastrointestinaltrakt stellen weitere Manifestationsorte des Lymphoms dar (Cortelazzo et al., 2012).

Aufgrund des sehr heterogenen und variablen Krankheitsbildes ist es oft schwierig, alle prognostischen Faktoren zusammenzufassen. Dabei werden einige der Faktoren für die Prognose als bestimmend angesehen. Der MCL International Prognostic Index, MIPI, erarbeitet nach Hoster, fasst die wichtigsten Parameter zusammen und vergibt entsprechend Punkte. Der Score enthält das Alter, das Geschlecht, den Allgemeinzustand nach ECOG sowie LDH-Werte und die Zahl der weißen Blutkörperchen der Betroffenen. Je höher die individuell erreichte Punktzahl, desto schlechter die Prognose. Allgemein sind hohe LDH-Werte, hohes Alter, B-Symptomatik, eine hohe Proliferationsrate des Ki-67-Proliferationsindex sowie p53-Alterationen mit einer schlechten Prognose assoziiert (Zhu et al., 2019). Die mittlere Überlebenszeit nach einer MCL-Diagnose beträgt etwa 5 Jahre (Dreyling, M et al., 2017).

Die Therapie des Mantelzelllymphoms kann in eine intensive und eine weniger intensive Therapie unterteilt werden. Bei Patienten unter 65 Jahren mit wenigen Komorbiditäten wird initial eine Kombination aus Rituximab, Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin und Prednison (R-CHOP) oder eine intensive Cytarabin-haltige Induktionstherapie (R-DHAP), gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation durchgeführt. Bei den älteren Patienten greift man typischerweise zum R-CHOP-Schema oder zu einer Kombination aus Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Bortezomib und Prednison (VR-CAP). Alternativ kann eine Kombination aus Bendamustin und Rituximab angewandt werden, welche in der Regel besser vertragen

und eher bei der indolenten Form empfohlen wird (Cheah et al., 2016; Dreyling, M et al., 2021).

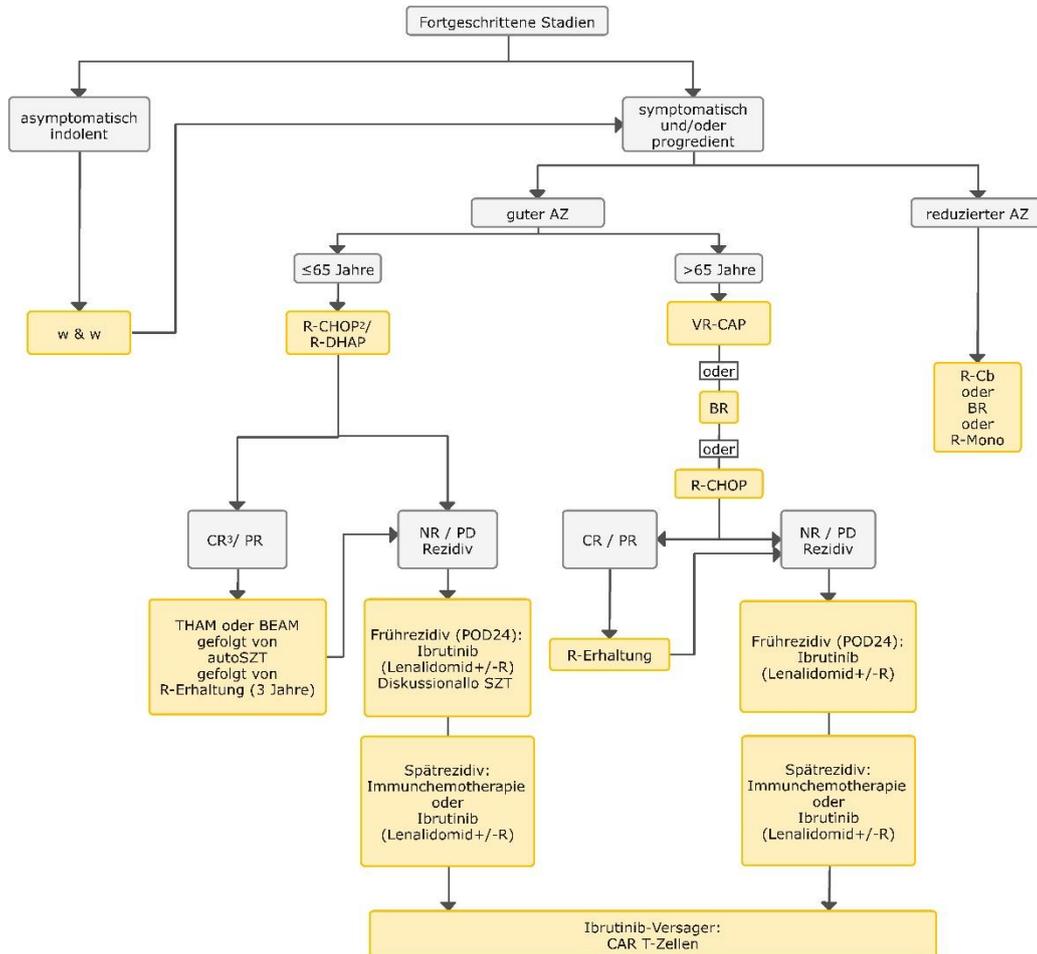


Abbildung 1: Therapieempfehlung. AZ, Allgemeinzustand; allo SZT, allogene Stammzelltransplantation; auto SZT, autologe Stammzelltransplantation; BEAM, Carmustin/ Etoposid/ Cytarabin/ Melphalan; BR, Rituximab/ Bendamustin; R-Cb, Rituximab/ Chlorambucil; R-CHOP, Rituximab/ Cyclophosphamid/ Doxorubicin/ Vincristin/ Prednison; VR-CAP, Rituximab/ Cyclophosphamid/ Doxorubicin/ Bortezomib/ Prednison; R-DHAP, Dexamethason/ hochdosiertes Cytarabin/ Cisplatin; R-Erhaltung, Rituximab Erhaltung; R-Mono, Rituximab Monotherapie; ABTHAM, Hochdosistherapie mit Ganzkörperbestrahlung (Total Body Irradiation)/ Cytarabin/ Melphalan; w&w, abwarten (watch & wait); CR, komplette Remission; NR, keine Remission (Non Response); PR, partielle Remission; POD24, Krankheitsprogression innerhalb von 2 Jahren

Das MCL ist durch konventionelle Therapieansätze nicht heilbar und neigt zu Rezidiven. Die molekularen und genetischen Vorgänge sind heute besser verstanden, wodurch die Erkrankung schneller und sicherer identifiziert werden kann. Dies erlaubt eine gezielte Therapie, die die Überlebenschancen verbessert. In den letzten Jahren wurden so eine Reihe von Targets identifiziert, die bei den therapieresistenten Formen

des Lymphoms oder Rezidiven gezielt mit Medikamenten wie z.B. Ibrutinib, Temsirolimus, Bortezomib, Lenalidomid behandelt werden (Dreyling, M. et al., 2016). Seit Neuestem ist außerdem die CAR-T-Zell-Therapie für diese Patienten zugelassen (Wang et al., 2020). Ein Überblick über den Therapie-Algorithmus ist in Abbildung 1 zusammengefasst.

2.1.2.1 PI3K und mTOR-Signalwege

PI3K/AKT/mTOR stellt einen der wichtigsten Signalwege in der Zelle dar. Dieser steuert die Proliferation, Zellwachstums, Zellgröße sowie Stoffwechselaktivität (Abbildung 2). Die Dysregulation der Gene dieses Signalweges wird bei vielen Tumoren beschrieben. Sie führt meist zur Überaktivierung und damit zu einem Wachstumsvorteil gegenüber nicht transformierten Zellen (Alzahrani, 2019). Die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges ist über eine Vielzahl zellmembranständiger Rezeptoren möglich. Dazu gehören unter anderem der B-Zell-Rezeptor, Zytokin-Rezeptoren sowie verschiedene Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Die Überaktivität dieses Weges spielt eine zentrale Rolle bei allen B-Zell-Lymphomen und so auch beim MCL (Rosich et al., 2014).

Als PI3K wird eine Gruppe von Lipidkinasen bezeichnet, die in 3 Klassen I, II, III eingeteilt werden. Die für das MCL wichtige Klasse I PI3K besteht aus 2 Untereinheiten: einer regulatorischen p85 und einer katalytischen p100. Im Gen der katalytischen Einheit findet man oft Amplifikationen. P100 existiert in 4 Isoformen: p100-alpha, p100-gamma, p100-beta und p100-delta. Die p100-alpha sowie p100-beta werden ubiquitär exprimiert. p100-delta und p100-gamma finden sich dagegen überwiegend in den Leukozyten, wobei p100-delta eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung der B-Zell-Rezeptoren innehat und daher in B-Zellen besonders hoch exprimiert wird. Nach der Aktivierung des B-Zell-Rezeptors wird CD19 über LYN phosphoryliert. Dabei wird durch eine Konformationsänderung die Bindung von PI3K an die SH2-Domäne des CD19 ermöglicht, wodurch die p100-delta-Einheit aktiviert wird. Diese katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat (PIP₃), welches als Second-Messenger-Molekül fungiert (Merolle et al., 2018). Dieser Schritt kann durch Dephosphorylierung von PIP₃ durch PTEN blockiert werden. In malignen transformierten Zellen ist dieses aber sehr oft mutiert und somit funktionslos (Chen, L.

et al., 2017). Im nächsten Schritt kann nun PIP3 das Enzym 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) aktivieren, das wiederum die Serin/Threoninproteinkinase AKT, die auch unter dem Namen Proteinkinase B bekannt ist, durch Phosphorylierung an der Threonin308-Stelle an der Zellmembran aktiviert (Ersahin et al., 2015; Gasparri et al., 2017; Yang et al., 2015). Auch die PDK1 ist nicht selten im MCL konstitutiv aktiv (Rizzatti et al., 2005).

Einerseits hemmt AKT nun den Tuberous-Sclerosis-Complex (TSC)1-TSC2 und mTORC1 wird an Serin2448-Stelle über die GTPase Ras homolog enriched in brain (RHEB) durch Phosphorylierung aktiviert (Gasparri et al., 2017), andererseits kann AKT ebenso den mTORC2 durch Phosphorylierung des mSIN1-Moleküls aktivieren (Yang et al., 2015). In MCL ist AKT oft durch eine somatische Mutation konstitutiv aktiviert (Ersahin et al., 2015).

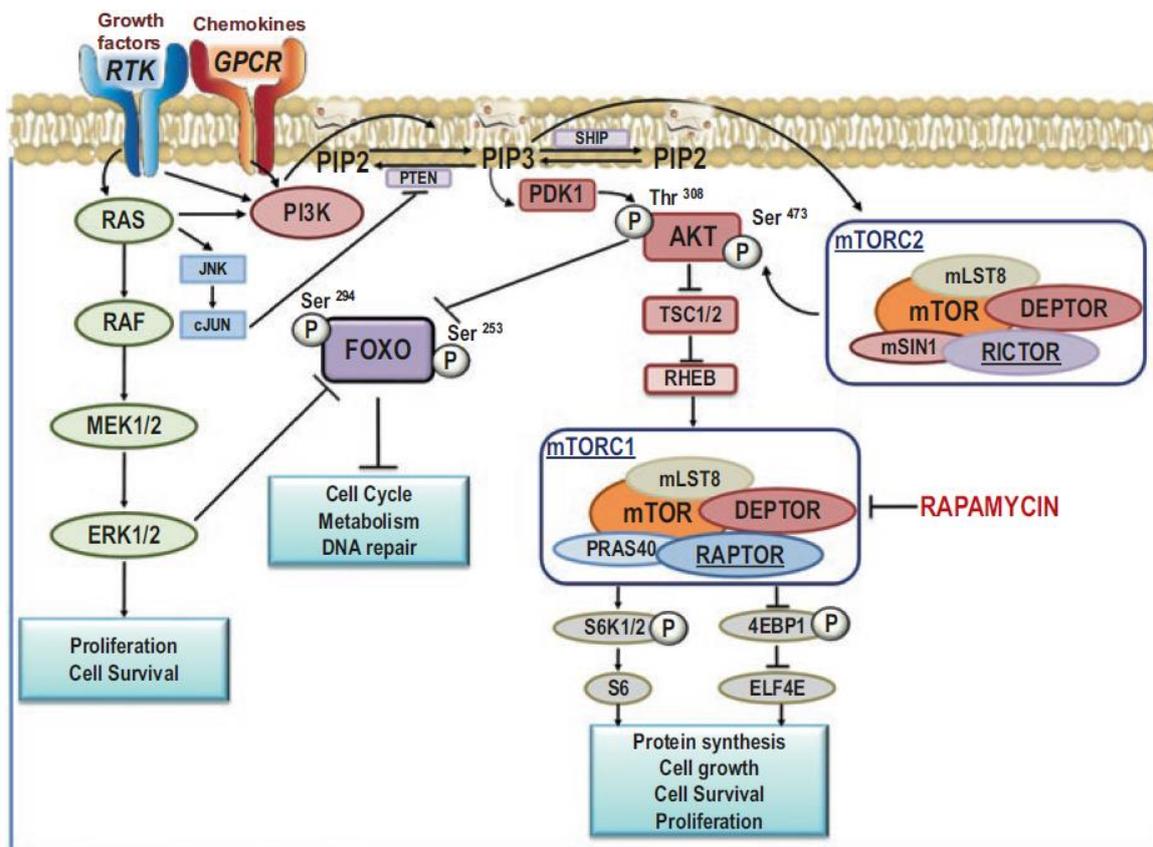


Abbildung 2: PI3K/AKT/mTOR und RAS/MEK/ERK Signalwege (Gurska et al., 2019)

mTOR ist eine Serin/Threoninproteinkinase und ein Multi-Proteinkomplex bestehend aus mTORC1 sowie mTORC2: mTORC1 beinhaltet das Protein Raptor und mTORC2 das Protein Rictor (Ersahin et al., 2015; Márk et al., 2013). Phosphoryliertes (aktiviertes) mTORC1 phosphoryliert die ribosomale Protein-S6-Kinase beta-1, die auch p70-S6-Kinase 1 (p60S6K1) genannt wird, und initiiert damit die Pyrimidin- und Purinsynthese und steigert die Lipidproduktion und den Glukosemetabolismus (Saxton et al., 2017b). Eine weitere wichtige Rolle für mTORC1 ist die Initiation der Translation von mRNA und damit der Proteinsynthese. Dabei hemmt mTORC1 das EIF4E-bindende Protein 1 (4EBP1) und leitet somit die mRNA-Translation der für die Zellproliferation notwendigen Schlüsselproteine ein. Dies geschieht, indem mTORC1 den am 5'-Ende der mRNA lokalisierten negativen Regulator der Translation 4E-BP1 durch Phosphorylierung inaktiviert, wodurch dieser vom 5'-Ende der mRNA verdrängt wird (Qin et al., 2016). Zu den so regulierten Schlüsselproteinen gehört unter anderem das Cyclin D1-Protein, welches den erfolgreichen Übergang von G1- in die S-Phase ermöglicht (Müller et al., 2013; Rosich et al., 2014).

Die Regulation des mTORC2, die Interaktion innerhalb des Multikomplexes zwischen mTORC1 und mTORC2 sowie die genaue Rolle von mTORC2 in der Tumorbiologie ist bisher noch nicht vollständig verstanden, seine Bedeutung wird aber durch therapeutische Erfolge durch seine Inhibition unterstrichen (Cybulski et al., 2009; Müller et al., 2013; Saxton et al., 2017a; Yang et al., 2015; Zou et al., 2016). Ein Anstieg des mTORC2-Proteingehaltes konnte bei Aktivierung des PI3K-Weges über PIP3 und AKT beobachtet werden. Dabei wird das Protein (SAPK)-interacting protein 1 (mSin1), das Teil des mTORC2 ist, an der Threonin86-Stelle phosphoryliert und löst sich damit vom restlichen mTORC2 ab (Yang et al., 2015). Nun kann im nächsten Schritt AKT am Serinrest 473 phosphoryliert und damit stabilisiert werden (Saxton et al., 2017a). Dieser Schritt ist für die Proliferation ebenso wie für das Überleben der Zelle wichtig und zählt somit zu einem der wichtigsten Einflüssen des mTORC2-Proteins (Sarbasov et al., 2005). Die negative Regulation von mTORC2 geschieht über eine Interaktion mit mTORC1. Dabei hemmt mTORC1 über p70S6K1 mTORC2 am Rictor-Protein sowie indirekt über IRS-1- und Grb10-Protein, die den PI3K-Weg inhibieren (Zou et al., 2016). Auch der Tuberous Sclerosis Complex (TSC) 2, der Teil des TSC1/TSC2-Komplexes ist, wirkt vermutlich negativ auf den mTORC2 ein (Mossmann et al., 2018). mTORC2 beeinflusst zudem die Zellmobilität sowie Zytoskelett-Stabilität der Zelle (Lamm et al., 2019).

2.1.3 Gezielte molekulare Therapie durch pan-PI3K und mTOR Inhibitoren

Der mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Signalweg ist bei vielen, möglicherweise sogar bei (fast) allen MCL konstitutiv aktiviert und trägt wesentlich zur Pathologie der Erkrankung bei (Pérez-Galán et al., 2011). Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren zunehmend Behandlungsansätze entwickelt, die gezielt den mTOR-Signalweg inhibieren. Bereits vor circa 10 Jahren war bekannt, dass das MCL auf Therapie mit klassischen mTOR-Inhibitoren wie Everolimus und Temsirolimus anspricht, insbesondere auch bei stark vortherafierten und älteren Patienten. Dennoch halten so erzielte Remissionen meist nur kurze Zeit an, da sich gegen diese Medikamente schnell Resistenzen entwickeln können, die über eine Vielfalt von Mechanismen wirken. Zudem spricht nur ein Teil der Patienten an (Smith, 2012). Neuere Alternativen schließen eine Doppelinhibierung von mTOR complex (mTORC1 und mTORC2) ebenso ein, wie eine kombinierte Inhibierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und mTOR-Signalwege. In in vitro Expressionsassays konnte bereits vor einigen Jahren gezeigt werden, dass die kombinierten PI3K/mTOR-Inhibitoren die Signaltransduktion über die PI3K/AKT/mTOR-Signalwege stärker inhibiert als eine Monotherapie mit pan-PI3K Inhibitoren (Rosich et al., 2014).

2.1.3.1 Pan-PI3K und dualer mTOR Inhibitor: PQR309

PQR309 (Bimiralisib) (PIQUR Therapeutics AG, Basel, Schweiz) ist ein oraler pan-PI3K Inhibitor, der alle vier Isoformen der Klasse I PI3K (alpha, beta, gamma und kappa) sowie mTORC1 und mTORC2 hemmt (Tarantelli, Gaudio, et al., 2018; Wicki et al., 2018). Die Eigenschaften des Inhibitors wie orale Verfügbarkeit, Penetration der Hirnblutshranke, gute Toleranz in Tierversuchen und seine antiproliferative Wirkung führten zur Phase-I/II-Studien-Zulassung im Jahr 2014 (Beaufils et al., 2017). Indikationen für den Einschluss in diese Studien waren therapieresistente Lymphome und Lymphome mit Befall des zentralen Nervensystems. Die Ziele der Phase-I/II-Studien waren Toleranzanalysen und Dosisfindung. Nach Abschluss der Phase-II-Studie waren die häufigsten Nebenwirkungen das Fatigue-Syndrom, Hyperglykämie, Diarrhoe und Nausea (Collins et al., 2021; Wicki et al., 2018). Zusammenfassend wies der Inhibitor eine mäßige Wirksamkeit bei einer relativ hohen Toxizität auf (Collins et al., 2021). Dennoch stellt PQR309 möglicherweise in Kombination mit anderen

Medikamenten ein vielversprechendes Medikament für die Therapie des MCL dar (Tarantelli, Gaudio, et al., 2018).

2.1.3.2 PIM-1

Proto-onkogen Serin/Threonine-Protein Kinase PIM ist in beinahe 42% aller humanen Mantelzelllymphomen konstitutiv aktiviert und überexprimiert (Hogan et al., 2008). Die Pim-1-Kinase wird in den gesunden Zellen über die STAT3- und STAT5-Signalwege aktiviert (Abbildung 3). Dieser Signalweg ist ein wichtiger Regulator von vielen proinflammatorischen Zytokinen, Tumornekrose Faktor (TNF)-alpha, Interferon (IFN)-gamma, aber auch von Wachstumsfaktoren wie Epidermal Growth Factor (EGF). Die PIM-1-Kinase aktiviert die Cyclin dependent kinase (CDK)-1 und ermöglicht den Übergang der Zelle von der G1- zur S-Phase und von der G2- in die M-Phase. In Tumorzellen mit konstitutiv aktiviertem PIM-1 ist damit der Zellzyklus konstitutiv hochreguliert und führt zu einem unkontrollierten Wachstum der Tumorzellen (Bachmann et al., 2005).

Der Wirkmechanismus der PIM-1-Kinase und der PI3K/mTOR-Signalweg weisen zahlreiche Überlappungen auf, was wiederum eine kompensatorische Wirkung vermuten lässt. So kann eine Ausschaltung des einen Signalweges durch Aktivierung des anderen ausgeglichen werden (Aziz et al., 2018). Ein Beispiel hierfür ist die bei akuter myeloischer Leukämie (AML) beschriebene Resistenz gegenüber PIM-Inhibitoren, die auf eine Überaktivierung der PI3K/mTOR-Signalwege zurückzuführen ist (Brunen et al., 2016). Andersrum kann ein aktiver PIM-1-Signalweg die Aktivierung der PI3K/mTOR-Signalwege in verschiedenen Tumorzellen aufrechterhalten (Rebello et al., 2018). Eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der PI3K-Signalkaskade ist vermutlich der Aktivierung von IRS-1 durch PIM-1 zuzuschreiben (Song et al., 2016). Zusätzlich finden sich zwischen PIM1 und PI3K/mTOR-Signalkaskade in den stromabwärts liegenden Effektormolekülen einige Überlappungen. Wesentliche Elemente dabei stellen der Eukaryotische Translations-Initiations-Faktor 4E (EIF4E) und dessen zellulärer Inhibitor EIF4E-bindendes Protein 1 (4EBP1) dar. Aktivierung beider Signalwege, sowohl des PI3K/mTOR als auch der PIM-1-Kinase, resultiert in Phosphorylierung von 4EBP1. Das ermöglicht ein Abtrennen des zytosolisch-inaktiven EIF4E, wodurch EIF4E in den Nukleus transloziert werden und eine Translation initiieren kann (Qin et al., 2016). Auch EIF4B kann durch stromabwärts von beiden

Signalwegen phosphoryliert werden und ebenfalls die Translation einleiten. Letzteres könnte die Kreuzresistenz bei der Inhibition nur eines dieser Signalwege bei vielen Tumorzellen erklären (Chen, K. et al., 2016). Entsprechend wies eine Kombination aus Inhibitoren der PI3K/mTORC1/2- und PIM-1-Signalwege in den verschiedenen Krebsarten bereits eine Synergie auf (Iqbal et al., 2016; Litchfield et al., 2020).

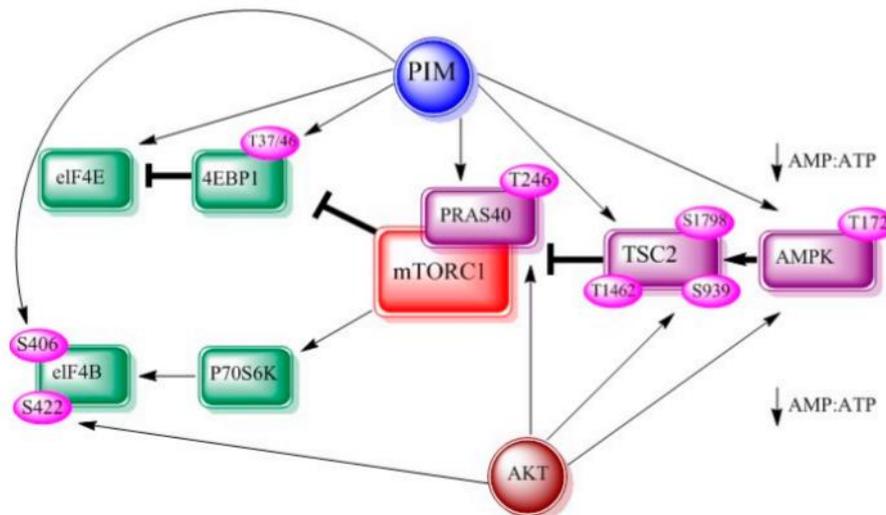


Abbildung 3: Interaktion zwischen PIM-1- und PI3K/mTOR-Signalwege (Aziz et al., 2018)

2.1.4 Zellseneszenz

Seneszenz ist ein biologischer Prozess im Zuge dessen die Teilung in der Zelle über Zellzyklusstop eingestellt wird. Zu den bekannten Auslösern der Seneszenz zählen unter anderem: Telomerverkürzung im Rahmen des Alterungsprozesses, DNA-Schäden, oxidativer Stress und onkogene Aktivierung. Die gemeinsame Endstrecke aller zur Seneszenz führenden Prozesse involviert die Tumorsupressorproteine: p53/p21 und p16 (Regulski, 2017). Kommt es über die oben erwähnten Trigger zu p53 Aktivierung, werden Zyklin-abhängigen Kinase (CD-Kinase) - Inhibitoren p16, p15, p21 und p27 aktiviert. Die Hyperphosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) entfällt, so dass dieses seine Bindung mit Transkriptionsfaktor E2F beibehält und somit die Synthese wichtiger Proteinen unterdrückt sowie das Fortschreiten des Zellzyklus blockiert wird (Muñoz-Espín et al., 2014).

Einen entscheidenden Einfluss auf neoplastisch-transformierten Zellen hat vermutlich auch die Stress-induzierte Seneszenz, zu deren Auslösern die Verkürzung von

Telomereenden, DNA-Schäden und medikamentöse Therapieansätze zählen. Die antiproliferative Wirkung der Stress-induzierten Seneszenz basiert auf der Auslösung des RAS/RAF/MEK/ERK/p38MAPK-Signalweges und resultiert in einer Aktivierung von p53. Dabei ist p53 einer der Hauptregulatoren des p21-Proteins (Karimian et al., 2016). Die transkriptionelle Aktivierung von p53 und p21 sowie deren proteasomaler Abbau wird durch die murinen Proteine, murine double minute (MDM)-2 und MDM-4 und ihre humanen Homologe HDM4 gesteuert. HDM4 ist in 95% der MCL aberrant im Nukleus exprimiert. Eine Stromab-Hemmung des MDM-Proteins führt zur gesteigerten Expression von p21 über die Aktivierung von p53 (Karimian et al., 2016; Liang et al., 2010). AKT spielt auch eine große Rolle in der Regulation von p21 - sowohl direkt als auch indirekt. Direkt kann AKT das p21-Protein an mehreren Stellen phosphorylieren und so die Progression der DNA-Synthese vorantreiben (Karimian et al., 2016). Indirekten Einfluss übt AKT-Kinase aus, indem sie das MDM2-Protein phosphoryliert und stromabwärts p53 proteosomal abbauen lässt. Als Resultat wird weniger p21 transkribiert. Zudem kann mTORC1 die Degradation des negativen Zellzyklusregulators p21 durch seine Interaktion mit 4E-BP1 aktivieren (Llanos et al., 2016).

Bei dem Tumorprozess scheint noch die onkogen-vermittelte Seneszenz ein maßgeblicher Faktor zu sein. Diese wird einerseits durch Onkogene und andererseits durch Verlust von Tumorsuppressorgenen verursacht. Bei der Ausschaltung des PTEN-Proteins beispielsweise wird der PI3K/AKT-Signalweg enthemmt und ist somit stets aktiv (Muñoz-Espín et al., 2014). Studien konnten belegen, dass diese Art von Seneszenz die p16 Transkription steigert. p16 ist nunmehr in der Lage, Zyklin D und die Zyklin-abhängigen Kinasen CDK4 oder CDK6 zu inhibieren, wodurch die Phosphorylierung von Tumorsuppressorprotein Rb unterdrückt wird. Ein Zellzyklusarrest ist die Folge (Helman et al., 2016).

Eine kurze Telomerendelänge kann ebenfalls eine zelluläre Seneszenz auslösen und zählt zu einem negativen prognostischen Marker bei chronischer lymphatischer Leukämie (CLL). Im Rahmen einer Studie konnte zudem bei 73 MCL-Patienten eine vermehrte Telomerlängenvariabilität gezeigt werden, wobei eine Assoziation mit der Prognose nicht nachgewiesen werden konnte (Jebaraj et al., 2013). Möglicherweise lag dies an der relativ niedrigen Anzahl der untersuchten Patienten mit MCL.

Die Fähigkeit einer Zelle die Seneszenz einzuleiten, hängt von einer komplexen Interaktion zahlreicher Signalwege und der Existenz eines physiologischen Expressionsmuster der in Seneszenz eingebundenen Proteine ab. So lag bei der Zelllinie Z-138 basierend auf FISH-Analysen das p53-Gensegment in beiden Kopien sowie eine nachweisliche Expression vor (Tucker et al., 2006). Die in der gleichen Arbeit durchgeführte Proteinanalyse wies ebenfalls eine p21-Expression auf. Aufgrund einer heterozygoten Deletion konnte jedoch keine Expression von p16 in Z-138 nachgewiesen werden (Tucker et al., 2006).

3 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Mantelzelllymphom (MCL) ist gekennzeichnet durch einen aggressiven klinischen Verlauf mit einer sehr schlechten Prognose und hoher Rezidivrate der Betroffenen. Um den Dysregulationen im B-Zell-Rezeptor-Signalweg entgegenwirken zu können, werden verschiedene gezielte Therapeutika entwickelt.

Gegenstand dieser Arbeit war es, die Rolle des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in der Pathogenese des MCL unter Anwendung niedermolekularer Substanzen zu untersuchen. Dies waren die Inhibitoren der pan-PI3K-Inhibitor CAL101 und die mTOR-Inhibitoren Temsirolimus, KU0063794; sowie der pan-PI3K/dual-mTOR-Inhibitor PQR309. In den Versuchen wurden die MCL-Zelllinien: Granta-519, Jeko-1, Z-138, Maver-1, Mino-1, Rec-1 verwendet.

Ziel dieser Untersuchungen war es, Dosis-Wirkungs-Kurven einzelner Substanzen sowie die Interaktionen verschiedener Substanzen anhand des Einflusses auf die Zellzahl der Zelllinien zu erstellen und zu charakterisieren. Zum anderen wurden die Substanzen sowie Kombinationen dieser Inhibitoren hinsichtlich des zeitlichen und dosisabhängigen Wirkungsprofils auf Zellzyklus und Apoptose genauer untersucht. Analysiert wurde zudem das Expressionsniveau von bestimmten Proteinen des PI3K/mTOR-Signalweges unter Behandlung mit den verschiedenen Inhibitoren und deren Kombinationen.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Zellkulturmedien und Zusätze

Beschreibung	Hersteller
FBS	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
RPMI 1640 Medium	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)

4.1.2 Inhibitoren und Zytostatika

Beschreibung	Hersteller	Verwendete Konzentration
ABT199	Selleckchem (Houston, TX, USA)	7,5nM – 5µM
AZD1208	Selleckchem (Houston, TX, USA)	1,25µM – 5µM
Bortezomib	Selleckchem (Houston, TX, USA)	5nM
CAL101	Selleckchem (Houston, TX, USA)	1,25µM – 5µM
Ibrutinib	Selleckchem (Houston, TX, USA)	1,25µM – 5µM
Idelalisib	Selleckchem (Houston, TX, USA)	1,25µM – 5µM
JQ-1	Selleckchem (Houston, TX, USA)	0,031µM – 0,125µM
KU0063794	Selleckchem (Houston, TX, USA)	0,125µM – 0,5µM
Niclosamid	Selleckchem (Houston, TX, USA)	0,125µM – 0,5µM
PD0325901	Selleckchem (Houston, TX, USA)	1,25µM – 5µM
PQR309	PQR309 Piquor Therapeutics AG (Basel, Schweiz)	0,25µM – 1µM
Ruxolitinib	Selleckchem	0,125µM – 0,5µM

	(Houston, TX, USA)	
SL0101	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH Steinheim, Deutschland	0,31µM – 1,25µM
Temsirolimus	Selleckchem (Houston, TX, USA)	10nM

4.1.3 Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft	Hersteller
ph.AKT Ser473	1:500	Rabbit	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)
ph.AKT Thr308	1:500	Rabbit	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)
ph.BP1 (Ser65)	1:500	Rabbit	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)
BP1 total	1:500	Rabbit	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)
CycD1	1:1000	Mouse	BDPHarmingen (NJ, USA)
GAPDH	1:20000	Mouse	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)
ph.p44/42 MAPK	1:500	Rabbit	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)
ph.MEK1/2	1:500	Rabbit	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)
ph.Raptor	1:500	Rabbit	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)
ph.Rictor	1:500	Rabbit	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)
ph.RB (Ser780)	1:2000	Rabbit	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)
ph.RB (Ser795)	1:1000	Rabbit	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)
ph.mTORC1 (2448)	1:500	Rabbit	Cell Signaling

			(Leiden, Niederlande)
ph.mTORC2 (2481)	1:500	Rabbit	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)
p21	1:500	Rabbit	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)

4.1.4 Lösungen, Puffer und Reagenzien

Beschreibung	Hersteller
Acrylamid Mix 30% Rotiphorese® Gel	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Albumin Fraktion V 5%	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
10X Annexin V Binding Buffer	BD Biosciences San Diego CA, USA
APS 10%	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Aqua bidest (millipore) L	Laboreigene Anlage
BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad Laboratories GmbH München, Deutschland
Bromphenolblau B-8026	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Cell-Proliferation Reagent (WST-1) Roche®	Roche® Mannheim, Deutschland
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability	Roche® Mannheim, Deutschland
Complete Lysis-M, EDTA free	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Complete Tablets, Mini, EDTA free	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
DMSO	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Elektrophorese Puffer	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU München
Gel Transfer Puffer	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU München
Gelatine	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
H2O2	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
LDS Sample Buffer (4X) NuPAGE®	ThermoFischerScientific Waltham, MA, USA
Luminol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Methanol	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumazid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
NET 10x (pH 7,7)	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU München
p-Coumaric Acid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH Berlin, Deutschland
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit BD Pharmingen™	BD Biosciences San Diego CA, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2,3 Sigma®	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	ThermoFisher Scientific, (Braunschweig, Deutschland)
Pre-Diluted Protein, Assay Standarts Bovine Serum Albumin	ThermoFischerScientific Waltham, MA, USA
Propidiumiodid-Lösung	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Protein Ladder: peqGold Prestained Protein-Marker V	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
RNase A Invitrogen™	ThermoFischerScientific Waltham, MA, USA
Sample Reducing Agent (10X) NuPAGE®	ThermoFischerScientific Waltham, MA, USA
SDS 10% (L4509)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
TBS 10x (pH 8,0)	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU München
Tetramethylethylendiamin (TEMED) (T-7024)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tris 1,5M (pH 8,8) Tris 1,5M (pH 6,8)	Apotheke Innenstadt des Klinikums der LMU München
Tween®20	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Vi-Cell®Reagent Pack	Beckman Coulter GmbH

(Krefeld, Deutschland)

4.1.5 Selbsthergestellte Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
5% Albumin	5 mg Albumin Fraktion V + 100 ml TBST-Puffer + 1 Spatelspitze Natriumazid
Einfriermedium	92 % FBS + 8 % DMSO
Elektrophorese-Puffer 10x	151,4 g Tris + 720,65 g Glycin + 50,00 g Natriumdodecylsulfat (SDS-4Na), zu 5 L mit ger. Wasser aufgefüllt
G-Net	1,25 g Gelatine + 50 ml NET 10x + 450 ml Aqua bidest
Gel-Transfer-Puffer	15,0 g Tris (0,25 M) + 71,0 g Glycin + 790 g Methanol, zu 5 L mit ger. Wasser aufgefüllt
5% Milch	5 mg Milchpulver + 100 ml TBST-Puffer
NET 10x ph 7,7	438,30 g NaCl + 93,60 g Na ₂ -EDTA (Titriplex III) + 302,85 g Tris + 25,00 g Triton X-100, zu 5 L mit ger. Wasser aufgefüllt
PI-Puffer	500 ml Aqua bidest + 40 ml Propidiumiodid + 500 µL Triton X + 500 mg Natriumcitrat, mit NaOH auf ph 8,0 eingestellt
SA	100 mg Luminol + 26,67 ml 1,5 M Tris ph 8,8 + 373,3 ml Aqua bidest
SB	44 mg p-Couramin Acid + 40 ml DMSO
Selfmade ECL	3 ml SA + 300 µL SB + 0,9 µL H ₂ O ₂
TAE-Puffer 10x pH 8,0	242,30 g Tris + 57,10 ml 100 % Essigsäure + 18,61 g EDTA-2Na-2H ₂ O (Titriplex III), zu 5 L mit ger. Wasser aufgefüllt
TBS-Puffer 10x ph 8,0	60,57 g Tris + 438,30 g NaCl, zu 5 L mit ger. Wasser aufgefüllt
TBST-Puffer	900 ml Aqua bidest + 100 ml TBS-Puffer + 1 ml Tween® 20
1,5M Tris-HCL (ph 8,8)	908,55 g Tris, zu 5 L mit gereinigtem Wasser aufgefüllt; pH mit HCl eingestellt
1,5M Tris (ph 6,8)	908,55 g Tris, zu 5 L mit ger. Wasser aufgefüllt; pH mit HCl eingestellt

4.1.6 SDS-Page Gele

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

4.1.7 Verwendete Software

Beschreibung	Hersteller
FlowJo Tree Star Inc.	Tree Star Inc. (Ashland, OR, USA)
Fusion FX7/SL ADVANCE	Vilber Lourmat Vilber Lourmat GmbH (Collégien, France) (Eberhardzell, Deutschland)
ImageJ 1.46r	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA
Microsoft Office 2003 (Win 7)	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Vi-Cell®Software 2.03	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)

4.1.8 Verwendete Geräte

Beschreibung	Hersteller
Centrifuge 5424R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5415 C/D	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA U.S.A.)
CO ₂ -Wärmeschrank/Inkubator	Binder GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Durchflusszytometer: BD FACS Canto II	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA)

Elektrophoresekammer Xcell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fusion SL	Vilber Lourmat Vilber Lourmat GmbH (Collégien, France) (Eberhardzell, Deutschland)
GloMax® Discover System GM3000	Promega Corporation (Madison, WI, USA)
Heizblock: HLC Blockthermostat BT1302	DITABIS AG (Pforzheim, Deutschland)
Laborabzug	TROX® Technik GmbH (Neukirchen-Vlyun, Deutschland)
Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Multipette®	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipetman®	Gilson Inc. (Middleton, WI, USA)
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)
Power-Pac 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Sicherheitswerkband BERNER FlowSafe®	BERNER International GmbH (Elmshorn, Deutschland)
Stuart®SRT 6 Roller Mixer	Bibby Scientific Limited (Staffordshire, UK)
Trans-Blot-SD Semi-Dry-Transfer-Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Transferpette® Multikanalpipette	BRAND SCIENTIFIC GMBH (Wertheim, Deutschland)
UniTwist 3D Schüttler	UniEquip GmbH (Planegg, Deutschland)
Vi-Cell® Vi-Cell®XR	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc. (Bohemia, NY, USA)
Waage	Kern und Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)
Wasserbad: GFL 1092	GFL GmbH (Burgwedel, Deutschland)
Zentrifuge: Rotanta 46 RC	Hettich Lab Technology (Tuttlingen, Deutschland)

4.1.9 Verbrauchsmaterialien

Beschreibung	Hersteller
BD Falcon (15ml)	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA)
BD Falcon (50ml)	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA)
Corning® Falcon™ Rundboden-Röhrchen	Corning Inc. (Corning, NY, USA)
Eppendorf-Tubes (versch. Größen)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Gel-loading tips 200 µl	Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland)
Glaspipetten: Corning Costar Stripette	Corning Inc. (Corning, NY, USA)
Membranen (Western Blot): Amersham Hybond-P	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Pipettenspitzen: OneTip®	Starlab GmbH (Hamburg, Deutschland)
Sarstedt Tubes (15ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Steriflip® Filtrationssystem Millipore	Millipore Corporation (Billerica, USA)
Vi-Cell Sample Cups	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Whatman GB003 Gel Blotting Papier	Whatman, Capitol Scientific, Inc., (Austin, Texas, USA)
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturplatten (6, 24, 96 Well)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Zelllinien – Charakterisierung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden kommerziell über die Deutsche Sammlung der Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Deutschland, erworben.

Die Tabelle 1 stellt die Charakteristika der MCL-Zelllinien zusammen.

Parameter	Granta-519	Rec-1	Jeko-1	Z-138	Maver-1	Mino-1
Alter	58	61	78	70	82	68
Entnahmeort	PB	LK	PB	KM	PB	PB
Geschlecht	w	m	w	m	m	w
Verdopplungszeit	49h	20-40h	50h	18-24h	48h	50h
Nachweis der t(11;14)(q13;q32)	Positiv +	Positiv +	Positiv +	Positiv +	Positiv +	Positiv +
Cyclin D1 Protein-Überexpression	Positiv +	Positiv +	Positiv +	Positiv +	Positiv +	Positiv ++
p16INK4a	-	n.a.	+	-	-	+
RB	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	+
Bcl-2	+	n.a.	+	-	+	+
BAX	+	n.a.	+	n.a.	n.a.	+
p21	+	n.a.	+	n.a.	-	+
p53	+	n.a.	-	+	+	++
TP53 Sequenz	WT	WT	WT	n.a.	M	M

Tabelle 1: Charakterisierung der MCL-Zelllinien (Amin et al., 2003; Camps et al., 2006; Drexler et al., 2002; Rudolph et al., 2004): PB- peripheres Blut, LK- Lymphknoten, KM- Knochenmark, w- weiblich, m- männlich, n.a.- not available, WT- Wildtyp, M- mutiert, + Protein exprimiert, - Protein nicht exprimiert

4.2.1.2 Bedingungen in der Zellkultur

Alle MCL-Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium, welches mit 10% fetalem Kälberserum (FBS) versetzt wurde, in Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im CO₂-Wärmeschrank kultiviert. Das FKS wurde vor Anwendung bei 56°C für 40 min hitzeinaktiviert, um das Komplementsystem des Serums zu deaktivieren. Anschließend wurde FKS in 50-ml-Röhrchen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Alle Zelllinien wurden nach Zellzahl dreimal pro Woche gesplittet. Der Austausch der Zellkulturflaschen erfolgte regelmäßig einmal pro Monat. Alle drei Monate wurden neue Zellen aufgetaut. Die Arbeit mit den Zellen fand in einer Sicherheitswerkbank BERNER FlowSafe® statt.

4.2.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

Die einzufrierenden Zelllinien wurden bei -4°C und bei 1000 rpm für 10 min aus der Zellsuspension abzentrifugiert und die pelletierten Zellen in 1 ml Einfriermedium, bestehend aus 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 90% FKS, resuspendiert. Es folgte ein sofortiges Einfrieren bei -80°C im Gefrierschrank. Die Zellzahl pro Kryoröhrchen betrug 1×10^7 /ml. Beim Auftauen wurden Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt und dann sofort in 15ml Zellkulturmedium verdünnt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert und die pelletierten Zellen in vorgewärmtes Medium 10ml in die Kulturfläche überführt.

4.2.2 Zellzahlbestimmung mittels Vi-Cell

Zur Ermittlung der Zellzahl und Zellviabilität wurde Vi-Cell® der Firma Beckman Coulter verwendet. Die Methode basiert auf der Färbung der Zellen mit dem polyanionischen Farbstoff Trypanblau, welcher nur die durchlässige Zellmembran von apoptotischen oder nekrotischen Zellen durchdringen kann. Dabei färben sich die apoptotischen/nekrotischen Zellen dunkelblau. Die intakte Zellmembran der vitalen Zellen ist fähig, das Trypanblau auszuschließen und damit präsentieren sich diese

Zellen im Phasenkontrast hell. Dieses Prinzip ermöglicht zwischen apoptotischen/nekrotischen und vitalen Zellen zu unterscheiden.

Zellproben wurden dazu mit Trypanblau im Vi-Cell® vermischt und anhand der Leuchtdichte analysiert. Aufgrund der im Vi-Cell® möglichen Kombination aus der Standard-Trypanblau-Methode und digitaler Bildanalyse war somit eine schnelle und reproduzierbare Zellanalyse möglich. Gemäß der Leuchtdichte wurden pro Probe 100 digitale Bilder ausgewertet und mittels dieser die Zellzahl und Zellviabilität bestimmt.

4.2.3 WST-1 Proliferationsassay

Um die Viabilität der MCL-Zelllinien zu bestimmen, wurde neben der Vi-Cell-Methode mittels Trypanblaufärbung der WST-1 Proliferationsassay verwendet. Die Methode basiert auf dem Nachweis der Metabolisierung des Tetrazoliums Salzes 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazoleo]-1,3-Benzendisulfonat und dessen Spaltung zum ringoffenen Formazan-Salz bei Vorliegen einer intakten mitochondrialen Atmungskette. Mit Anstieg der Proliferationsrate der lebenden Zellen nimmt auch die die Spaltung des Tetrazoliums Salzes zu. Der dabei entstehende Farbumschlag kann kolorimetrisch mithilfe des Spektrophotometers GloMax®Discover (GloMax-Reader) detektiert werden. Das Absorptionsmaximum des Formazan-Salzes liegt zwischen 420 und 480 nm bei ca. 440nm.

Die Durchführung der Methode erfolgte anhand der Protokolle und Kits von Roche Diagnostics (Mannheim). Die Zellen wurden auf die gewünschte Dichte ($0.05 \times 10^6/\text{ml}$) gesplittet und in 96-Well-Platten mit flachem Boden als Triplet angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden oder 48 Stunden wurden den Zellen das WST-1-Reagenz mit einem Volumen von 10 μl zugesetzt und nach 4 Stunden am GloMax® Discover gemessen.

4.2.4 Durchflusszytometrie

4.2.4.1 Funktionsweise der Durchflusszytometrie

Zur weiteren Charakterisierung von Zelllinien, wie Größe, Form und Beschaffenheit der Zellmembran, wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Die Zellen passieren

dabei einen Laserlichtstrahl und erzeugen anhand der unterschiedlichen Eigenschaften eine spezifische Streuung. Diese Streuung wurde mit folgender Unterscheidung detektiert: in Vorwärtsrichtung (forward scatter, FSC) gestreutes Licht stellte die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) zeigte die Granularität der Zelle.

4.2.4.2 Analyse des Zellzyklus (Propidiumiodid-Färbung)

Die Zellteilung einer Zelle wird durch einen streng kontrollierten Zellzyklus gewährleistet. Dabei werden Mitosephase und Interphase unterschieden. Die Zelle durchläuft während einer Interphase folgende Phasen: G0/G1-Präsynthese-Phase, die die Wachstumsphase der Zelle darstellt. Hier werden zusätzlich mehrere RNA- und Kernproteine produziert (Bertoli et al., 2013). Die Zelle in der Interphase reagiert sehr sensitiv auf jegliche Proliferationssignale. An diesem Punkt wird entschieden, ob die Zelle sich weiter teilt oder zu einer ruhenden Zelle wird. Teilt sich die Zelle weiter, geht sie in die S-Phase über. Der G1/S-Phasen-Übertritt zählt zu einem der wichtigsten Kontroll- und Restriktionspunkte des Zellzyklus. Das Ziel der S-Phase ist die rasche DNA-Synthese mit Verdopplung der Chromosomen. Nun findet die Vorbereitung auf die Mitose in der G2-Phase statt. Die Voraussetzung dafür ist die absolute Fehlerfreiheit der replizierten DNA: werden DNA-Schaden detektiert, können diese über Reparaturmechanismen behoben werden. Die Zelle ist damit bereit, in die Mitose überzugehen, um sich zu teilen (Bertoli et al., 2013).

Zur Analyse des Zellzyklus wurden 500 000 (1×10^6) Zellen pro FACS-Röhrchen pipettiert und mehrmals mit Phosphat-gepufferte Salzlösung nach Dulbecco (DPBS) gereinigt und abzentrifugiert. Anschließend wurde die Zellsuspension nach Zugabe von 1ml Ethanol für 30 Minuten inkubiert. Dieses Vorgehen ermöglichte die Durchlässigkeit der Zellmembran für Propidiumiodid (PI). Nach Zugabe des PI und des Lysispuffers wurden Proben am FACS analysiert. Im Histogramm wird zur Analyse auf der X-Achse die PI-Menge und auf der Y-Achse die Anzahl der Ergebnisse dargestellt. PI kann in die DNA interkalieren, was seine Fluoreszenz intensiviert. Der erste Peak im Histogramm entspricht den Zellen in der G1-Phase mit einfachem Satz an DNA und der zweite Peak enthält Zellen in der G2-Phase mit doppelter DNA-Menge. Dazwischen liegen die Zellen in der S-Phase. Es wurden jeweils 20000 Ereignisse gemessen und die Daten mit dem Softwareprogramm FlowJo ausgewertet.

4.2.4.3 Analyse der Apoptose (Annexin V-PE und 7-AAD Färbung)

Zur Bestimmung der Apoptose wurde das „Annexin V-PE Apoptosis Detektion Kit I“ von BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der einen programmierten Zelltod hervorruft. Die ersten messbaren Veränderungen sind ein Verlust der Symmetrie der Zellmembran. Das Lipid-Phosphatidylserin, welches sich bei der intakten Zelle nur auf der inneren Seite der Membran befindet, ist bei apoptotischen Zellen auch auf der Zellaußenseite nachweisbar. Annexin V kann nun in Anwesenheit von Ca^{2+} an Phosphatidylserin binden und die Zelle anfärben, was bei der intakten Plasmamembran unmöglich ist. Alleine durch Färbung mit Annexin V gelingt es nicht, zwischen den apoptotischen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Mithilfe von 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) lassen sich die nekrotischen Zellen abgrenzen. Im Rahmen der Nekrose kommt es zu irreparablen Schäden an der Zellmembran und dem Zellkern. Als Folge interkaliert 7-AAD in die DNA zwischen den Basen Guanin und Cytosin. Durch Doppelfärbung mit Annexin V und 7-AAD können damit vitale, nekrotische und apoptotische Zellen unterschieden werden: Intakte Zellen sind Annexin V-PE negativ, 7-AAD negativ, frühapoptotische Zellen sind Annexin V-PE positiv und 7-AAD negativ, und spätapoptotische und nekrotische Zellen weisen doppelte Positivität von Annexin V-PE und 7-AAD auf.

Zur Analyse der Apoptose wurden 1×10^6 Zellen pro FACS-Röhrchen pipettiert und mehrmals mit DPBS gereinigt und abzentrifugiert. Anschließend wurden Zellen mit Annexin V-PE und 7-AAD gefärbt. Die Proben wurden am Durchflusszytometer gemessen und analysiert und die so gesammelten Daten wurden mithilfe des FlowJo-Softwareprogramms ausgewertet.

4.2.5 Western Blot und Proteinanalyse

Mithilfe des Western Blots wurden in dieser Arbeit gewünschte Proteine identifiziert und quantifiziert. Zur Proteingewinnung wurden pro Probe 10^6 Zellen entnommen, zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die Proben wurden mit Lysispuffer (20% Glycerin, 4% SDS, 100 mM Tris, 10% beta-Mercaptoethanol) lysiert und bei 96°C denaturiert. Zur besseren Darstellung der Proteine wurden die Proben mit $10\ \mu\text{l}$

Bromphenolblau angefärbt. Im nächsten Schritt wurde das Proteingemisch mittels Elektrophorese auf einem 10%-SDS-PAGE-Gel nach Molekulargewicht aufgetrennt. Um die Proteine auf die PVDF-Membran zu überführen, wurde eine Transferkammer benutzt. Danach wurden die Membranen in 5%iger Milch-TBST-Lösung für eine Stunde geblottet, anschließend in TBST gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen in TBST gewaschen und eine Stunde mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Eine selbsthergestellte ECL-Lösung wurde dazugegeben. Das Binden des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper ermöglichte die Oxidierung des Luminols mit Emission von Licht. Die Chemilumineszenz wurde dann an der hochsensitiven Kamera Fusion SL detektiert und mithilfe der Software Fusion FX7/SL ADVANCE analysiert.

4.2.6 Fraction of Product

Um synergistische Effekte zweier in Kombination verabreichter Medikamente einschätzen zu können, wurde folgende Formel angewandt. Die fraction of affected (FA) berechnet sich aus dem Verhältnis der Zellzahlen der behandelten Proben zu der unbehandelten Kontrolle: Veränderungen der Zellzahlen der behandelten Probe im Vergleich zu den Zellzahlen der unbehandelten Kontrolle wurden in Prozent grafisch dargestellt.

FA (fraction affected cells) = $((1-FA \text{ Substanz X}) * (1-FA \text{ Substanz Y}) - (1-FA \text{ Kombination Substanz X+Y}))$.

Diese Methode nach Webb stammt aus dem Jahr 1963 (Webb, 1963). Dabei werden die Werte, die größer 0.1 sind, als synergistisch, solche, die kleiner 0.1 sind, als antagonistisch und die Werte dazwischen als additiv gewertet.

4.2.7 Statistische Auswertungen

Zur Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit wurden Mittelwert und Standardabweichung der erhobenen Parameter berechnet und grafisch mittels Microsoft Excel abgebildet.

5 Ergebnisse

5.1 Viabilitäts- und Proliferationsassay

5.1.1 PQR309

In den folgenden Versuchen wurden die Zellreihen Granta-519, Jeko-1, Z-138, Mino-1, Maver-1 und Rec-1 mit PQR309 in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 0,0625 μM und 1 μM behandelt, um dabei Effekte auf Zellproliferation und Zellviabilität zu analysieren. Zunächst wurden die Zellreihen auf 0.5×10^6 verdünnt und jeweils nach 24h, 48h und 72h mittels Trypanblau-Ausschlusstest am Vi-Cell gemessen. Im Anschluss wurde das Verhältnis der Zellzahlen zu Kontrollwerten ausgewertet, da jede Zelllinie eine individuelle Verdopplungszeit aufweist. Die unbehandelten Zellen stellen dabei den Kontrollwert dar. Der Mittelwert aus drei Experimentreihen wurde mittels der Standardabweichungsanalyse ausgewertet.

Während die Behandlung der Zelllinie Granta-519 mit 0,0625 μM und 0,125 μM PQR309 die Proliferation nicht signifikant beeinflusste, war bei Jeko-1 und Maver-1-Zellen bei dieser Konzentration die Proliferation leicht reduziert. Granta-519 zeigte auch bei einer PQR309-Konzentration von 0,25 μM keine reduzierte Proliferation, während die Proliferation von Jeko-1 und Maver-1-Zellen bei dieser Konzentration leicht reduziert war. Eine PQR309 Konzentration von 0,5 μM reduzierte die Tetrazoliumsalzkonzentration um circa 40% in Jeko-1 und Maver-1-Zellen. Granta-519-Zellen zeigten auch bei dieser Konzentration eine höhere Resistenz, was sich durch eine Reduktion der Proliferation um lediglich 20% ausdrückte. Die höchste eingesetzte PQR309-Konzentration reduzierte die Proliferation der Granta-519- und Maver-1-Zellen um jeweils 40%, während Jeko-1 mit einer Reduktion von mehr als 60% auch hier empfindlicher reagierte.

Die Mino-Zelllinie zeigte ein ähnliches Resistenzmuster wie die Granta-519-Zellen, das heißt, nach 48 Stunden Kulturdauer zeigte sich im WST-Proliferationsassay mit dieser Zelllinie erst ab einer PQR309-Konzentration von 0,5 μM eine Reduktion der Proliferation um 20% und mit einer Konzentration von 1 μM um knapp 40% (Abbildung 4). Die Zelllinie Rec-1 war in etwa gleich empfindlich gegenüber PQR309 wie die Linie

Jeko-1, während Z-138 eine ähnliche moderate Empfindlichkeit aufwies wie die Maver-1-Zelllinie.

Insgesamt wurde für die weiteren Versuche in dieser Arbeit die Konzentration von 1 μM als durchschnittliche IC_{50} festgelegt, welche mittels WST ermittelt wurde. Ein vollständiger Proliferationsstopp konnte bei keiner der MCL-Zellreihen erzielt werden, jedoch wurde die Wachstumsgeschwindigkeit bei allen MCL-Zellreihen mit dieser PQR309-Konzentration deutlich langsamer.

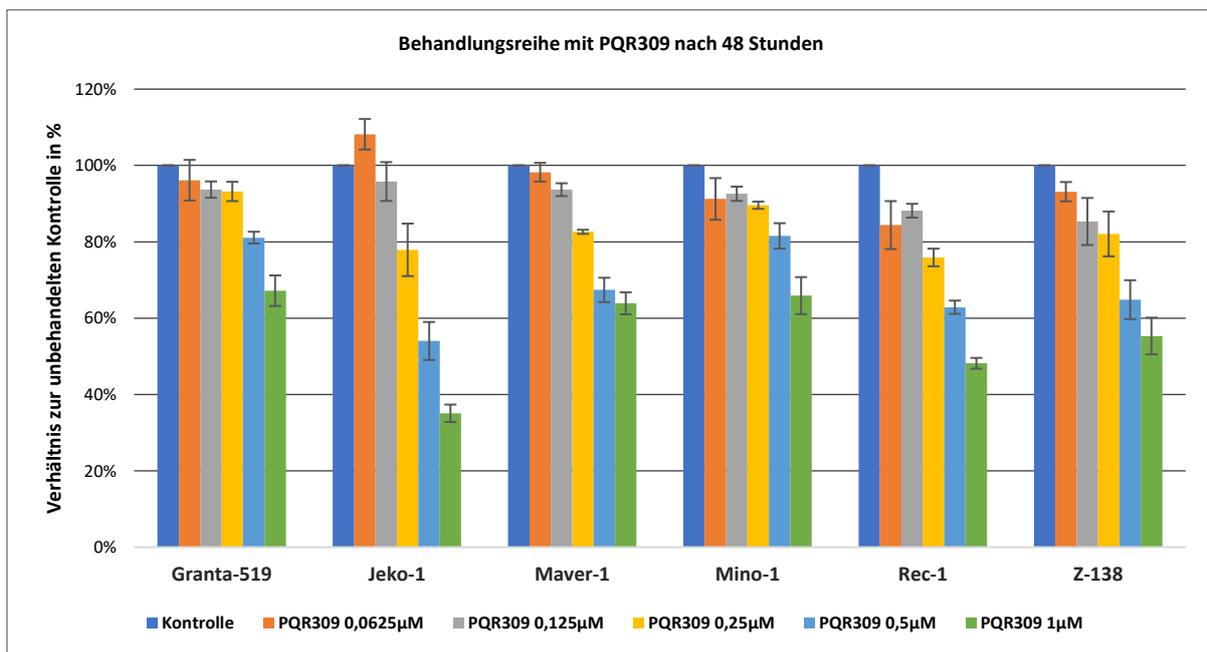


Abbildung 4: Mantelzelllymphomzellen Granta-519, Jeko-1, Maver-1, Mino-1, Rec-1 und Z-138 nach Behandlung mit PQR309 in steigenden Konzentrationen und Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden. Die abgebildeten Werte jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen

Die mithilfe des Vi-Cell gemessene Viabilität der Zellen nach 72 Stunden Kulturdauer (Abbildung 5), bestätigte im Allgemeinen die im WST- Proliferationsassays bestimmten Daten. So zeigte sich anhand der Viabilitätsdaten, dass die Granta-519-Zelllinie besonders resistent gegenüber PQR309 war. Während für die Zelllinien Jeko-1, Rec-1 und Z-138 die im Vi-Cell-Assay erlangten Ergebnisse ziemlich genau denen entsprachen, die auch im Proliferationsassay gemessen wurden waren, ergab sich auf Grundlage der Viabilitätsdaten für Maver-1 eine höhere Resistenz gegenüber PQR309 nach 48 Stunden und für die Mino-1-Zellen eine etwas höhere Ansprechrate auf die

PQR309-Behandlung. Alle getesteten Zelllinien wiesen eine deutliche Reduktion der Viabilität nach 72 Stunden Kulturdauer mit einer PQR309-Konzentration von 1 μM auf.

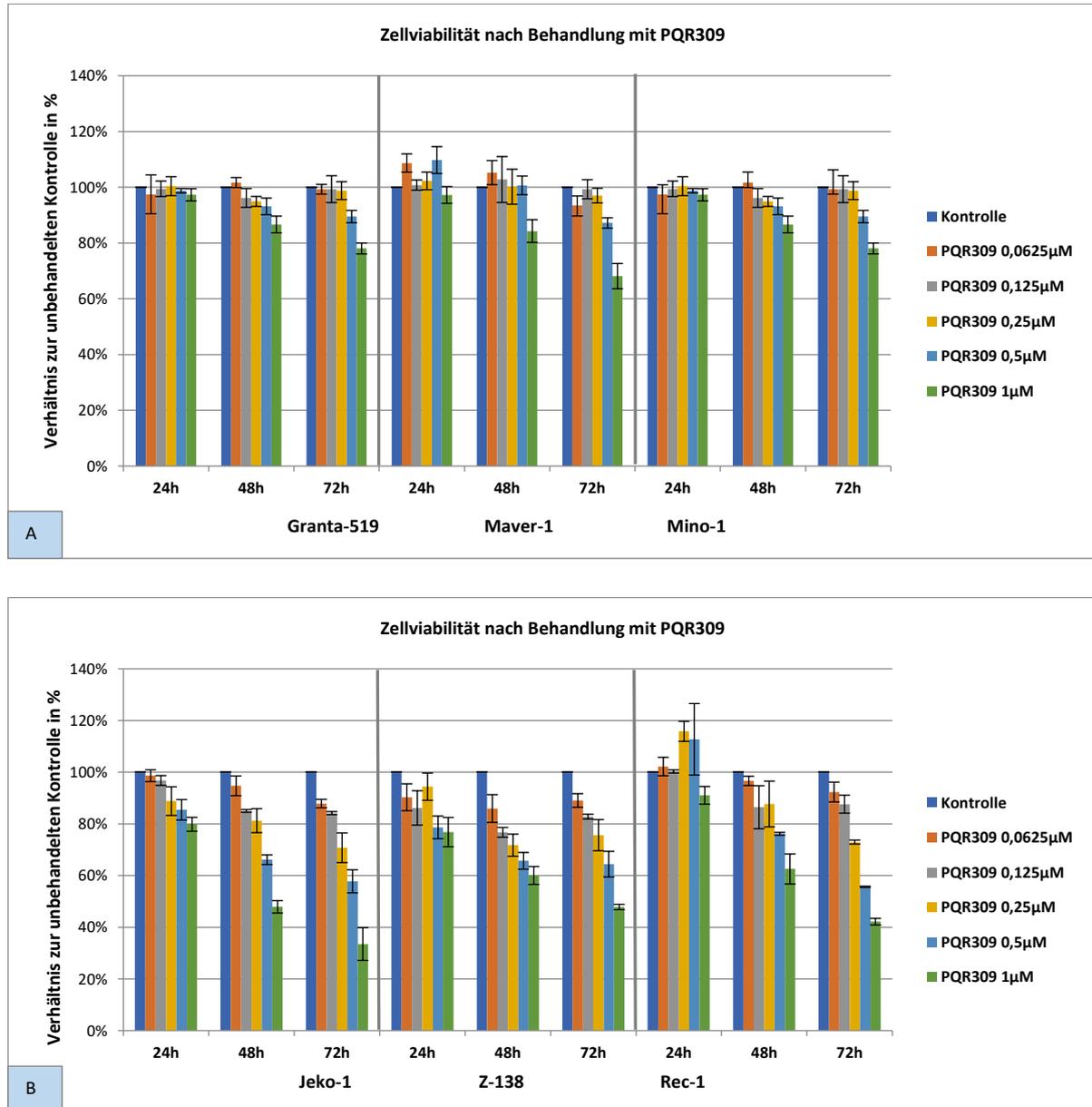


Abbildung 5: Zellviabilität der Mantelzelllymphomzellen nach Behandlung mit PQR309 nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-Cell-Methode; A: Granta-519, Maver-1 und Mino-1 als weniger und B: Jeko-1, Z-138 und Rec-1 mehr sensitive Zelllinien

5.1.2 Pan-PI3K-Inhibitor, mTORC1-Inhibitor, mTORC1/C2-Inhibitor sowie Kombinationsexperimente

Um die Frage zu klären, wie sich andere PI3K-Inhibitoren als Monotherapie oder in Kombination mit mTOR-Inhibitoren verhalten, wurden der PI3K-Inhibitor CAL101, der

mTORC1-Inhibitor Temozolomid und der mTORC2-Inhibitor KU0063794 verschiedenen Zelllinien zugesetzt und Proliferation und Zellviabilität gemessen. Dabei wurden Zelllinien jeweils mit dem PI3K-Inhibitor CAL101, dem mTORC1-Inhibitor Temozolomid und dem mTORC2-Inhibitor KU0063794 in Monotherapie sowie einer Kombination aus CAL101 und Temozolomid und CAL101 und KU0063794 behandelt. Danach wurden die Ergebnisse mit denen der unter Behandlung mit PQR309 erlangten Resultate verglichen. Die verwendeten Konzentrationen entsprachen sowohl den in der Arbeitsgruppe angewandten als auch den im Rahmen der Literaturrecherche erhobenen Werte. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde der Trypanblau-Ausschlusstest nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden Kulturdauer verwendet. Die Proliferation der Zellen wurde wie bereits oben mit dem WST-Test gemessen.

Nach der Behandlung mit CAL101 und Temozolomid in Monotherapie konnte nach 48 Stunden nur ein sehr geringer Effekt auf die Teilungsrate der Zelllinie Granta-519 festgestellt werden (Abbildung 6, A). Die Kombination von CAL101 und Temozolomid zeigte im Vergleich zu CAL101 alleine bei Granta-519 keinen zusätzlichen additiven oder synergistischen Effekt. Die Teilungsrate bei Jeko-1 nach Einsatz der Kombination von CAL101 und Temozolomid war etwas geringer als in Monotherapie (Abbildung 6, B).

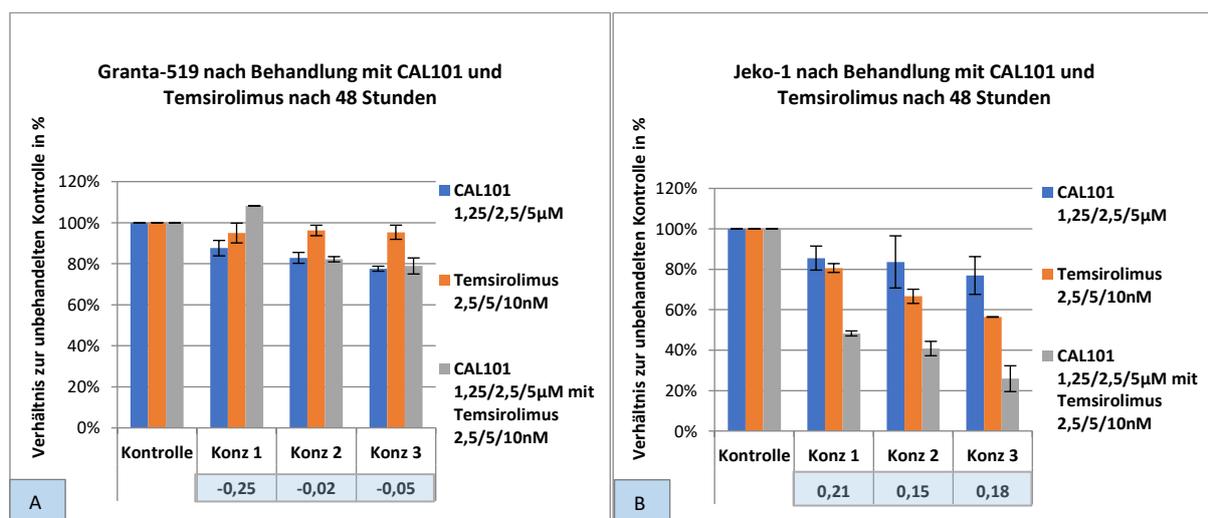


Abbildung 6: Proliferation von Granta-519 (A) und Jeko-1 (B) nach Behandlung mit CAL101 und Temozolomid in Monotherapie sowie in Kombination nach Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden. Die abgebildeten Werte jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die untere Zeile zeigt Fractions of product-Werte: „> +0.1“ synergistisch, zwischen „0.1 und -0.1“ additiv, „< -0.1“ antagonistisch

KU0063794 als Monotherapie reduzierte die Proliferation beider Zelllinien stärker als die anderen beiden Substanzen. Die Kombination von KU0063794 mit CAL101 hatte bei Granta-519 einen additiven Effekt auf die Reduktion der Zellteilung (Abbildung 7, A).

Ein starker Effekt auf die Teilungsrate der Jeko-1 fiel bereits in Monotherapie mit KU0067397 auf. Die Kombination mit CAL101 brachte einen starken synergistischen Kombinationseffekt auf Jeko-1. Die zunehmende Konzentration von KU0063794 lieferte eine additive Wirkung (Abbildung 7, B).

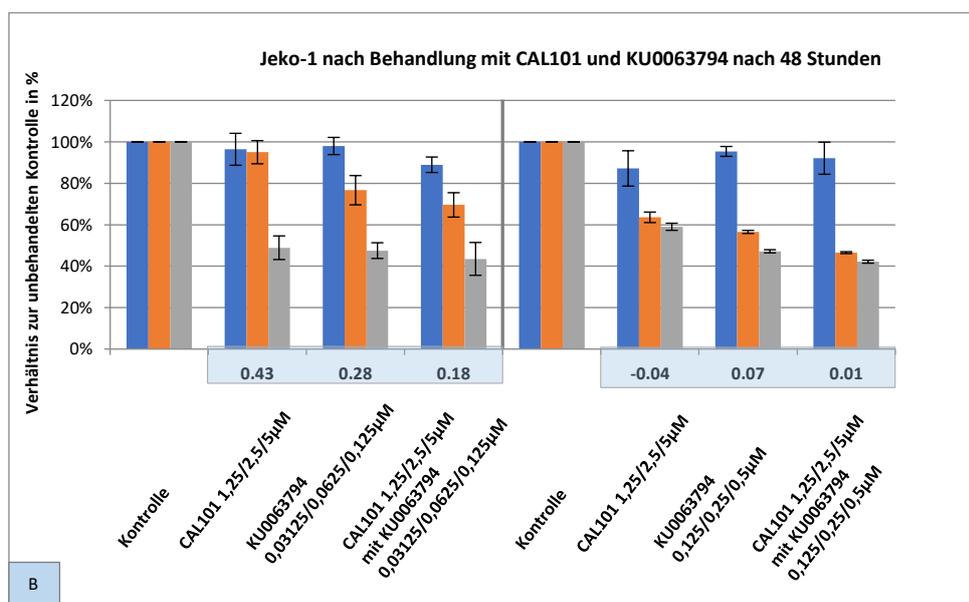
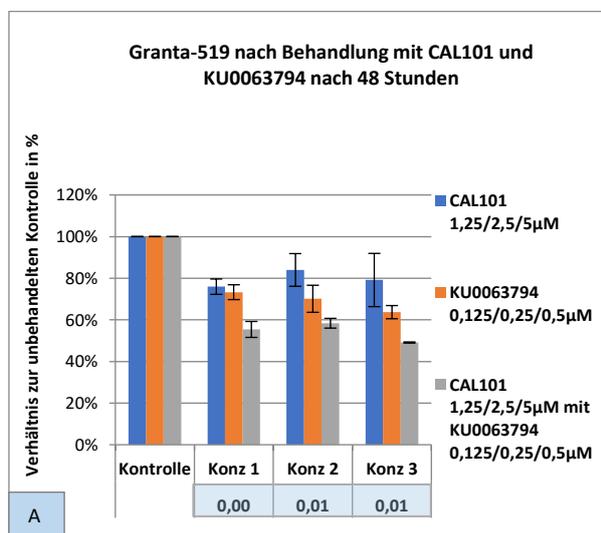


Abbildung 7: Proliferation von Granta-519 (A) und Jeko-1 (B) nach Behandlung mit CAL101 und KU0063794 in Monotherapie sowie in Kombination nach Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden. Die abgebildeten Werte jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die untere Zeile zeigt Fractions of product-Werte: „> +0.1“ synergistisch, zwischen „0.1 und -0.1“ additiv, „< -0.1“ antagonistisch

Bei der Betrachtung der Viabilität der Zellen zeigte sich ein ähnliches Bild. Behandlung der Zellen monotherapeutisch mit CAL101 und Temsirolimus oder einer Kombination der beiden führte nur zu einer leichten Reduktion der Viabilität der getesteten Zelllinien. Am stärksten war die Wirkung bei den Jeko-1-Zellen ausgeprägt (Abbildung 8, B). Bei Z-138 verminderte sich die Zellzahl nach Behandlung mit CAL101 nach 72 h um 20%, eine zusätzliche Gabe von Temsirolimus hatte keine weitere Wirkung (Abbildung 8, C).

KU0063794 alleine erzielte hingegen bei allen drei Zelllinien eine stärkere Reduktion der Zellzahlen als in Monotherapie mit CAL101 und Temsirolimus oder der Kombination aus den beiden. Eine Zugabe von CAL101 zur KU0063794-Behandlung hatte bei Granta-519-Zellen nur einen geringen Effekt, führte aber bei Jeko-1- und Z-138-Zellen zu einer weiteren deutlichen Reduktion der Viabilität.

Vergleicht man die Effekte einzelner Substanzen in Monotherapie sowie in Kombinationen mit den Effekten der PQR309-Behandlung bei Granta-529, Jeko-1 und Z-138 so zeichnet sich eine deutliche Tendenz ab - die beinahe identische Wirkung auf die Zellviabilität durch die Kombination von CAL101 und KU0063794 im Vergleich zum PQR309.

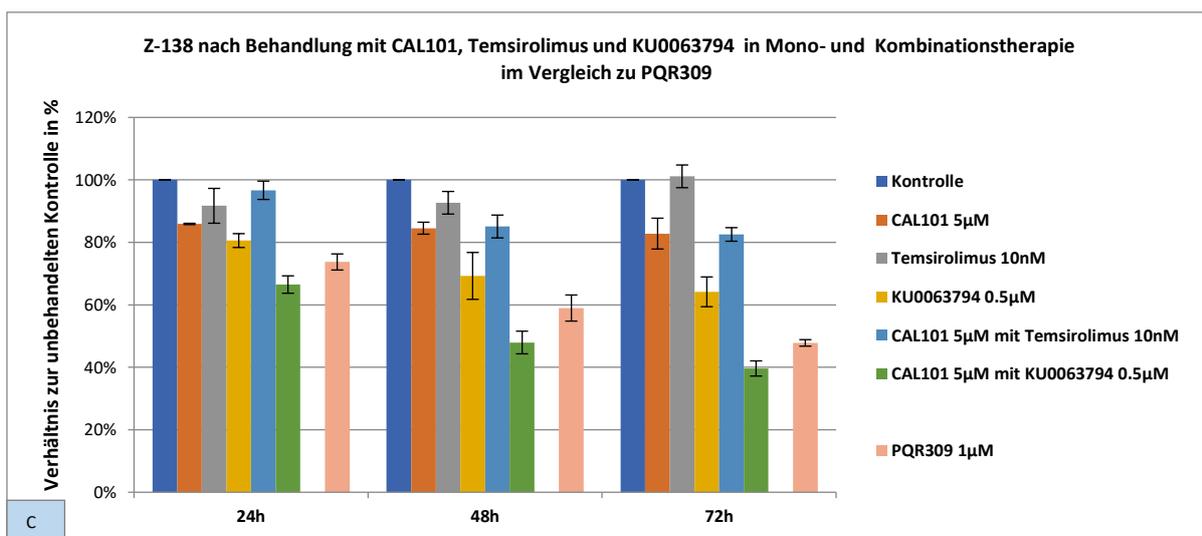
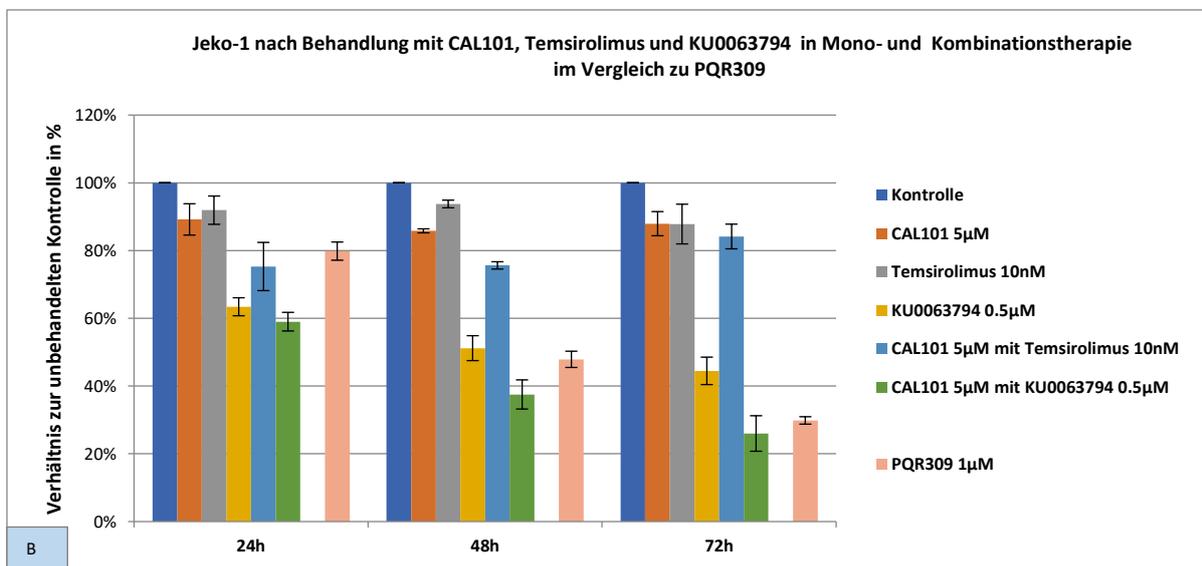
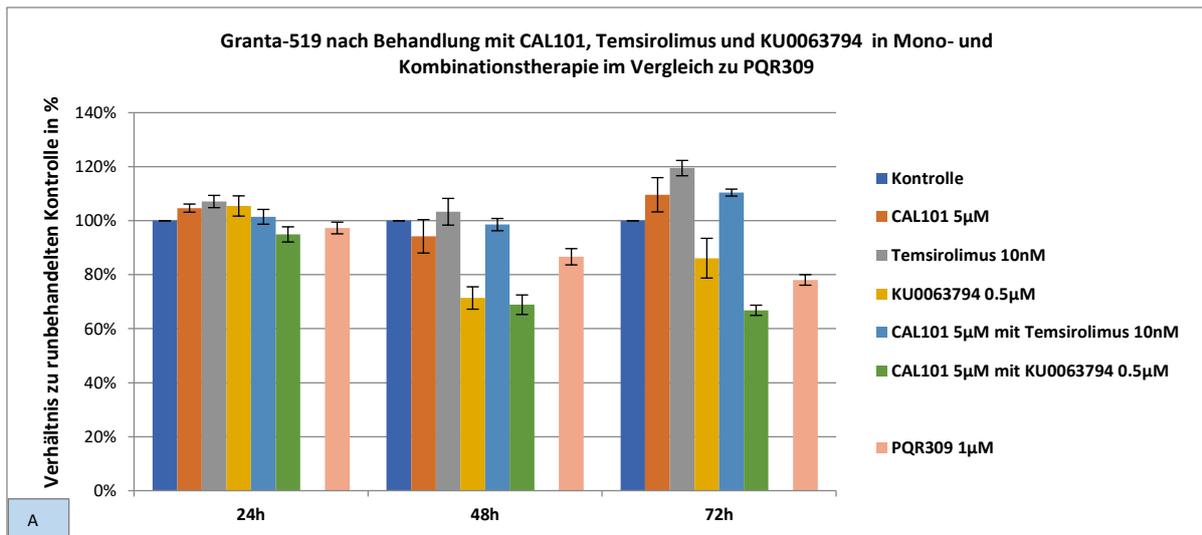


Abbildung 8: Zellviabilität der Granta519 (A), Jeko-1 (B) und Z-138 (C) nach Behandlung mit CAL101, Temozolomid und KU0063794 in Monotherapie sowie in Kombination aus CAL101 mit Temozolomid und CAL101 mit KU0063794 im Vergleich zu PQR309 nach 24 48 72 h mittels Vi-Cell-Methode

5.1.3 PQR309 und verschiedene Kombinationspartner

Um einen effektiven Kombinationspartner für PQR309 zu identifizieren, welcher einen Vorteil gegenüber der Monotherapie aufweisen würde, wurde PQR309 mit Inhibitoren weiterer im MCL aktivierter Signalpfade kombiniert eingesetzt. Verwendet wurden hierzu jeweils eine Kombination von PQR309 mit dem STAT3-Inhibitor Niclosamid, dem Jak1/2-Inhibitor Ruxolitinib, dem MEK-Inhibitor PD0325901, dem BCL-2-Inhibitor ABT199, dem RSK-Inhibitor SL0101-1, dem BTK-Inhibitor Ibrutinib, dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib, dem BET-Inhibitor JQ1 und dem PIM1-Kinase-Inhibitor AZD1208. Die eingesetzten Konzentrationen der Substanzen beruhten auf den im Vorfeld für die MCL-Zelllinien bestimmten IC50-Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren. Die Zellen wurden monotherapeutisch und in Kombination mit PQR309 behandelt und mittels WST-1-Proliferationsassay nach 48 Stunden analysiert.

Während bei Z-138 und Granta-519 mit der Kombination aus PQR309 und Niclosamid keine weitere Reduktion der Proliferation gegenüber der Wirkung von Niclosamid als Monotherapie festgestellt werden konnte, traten bei Jeko-1 antagonistische Effekte dieser Kombination auf. Die Proliferation der Zellen, die mit einer Kombination aus PQR309 und Niclosamid behandelt worden waren, war stärker als die der Zellen, die nur mit PQR309 behandelt worden waren (Abbildung 9, A). Die Kombination von PQR309 und Ruxolitinib wirkte sich additiv auf Granta-519 und Jeko-1 aus (Abbildung 9, B).

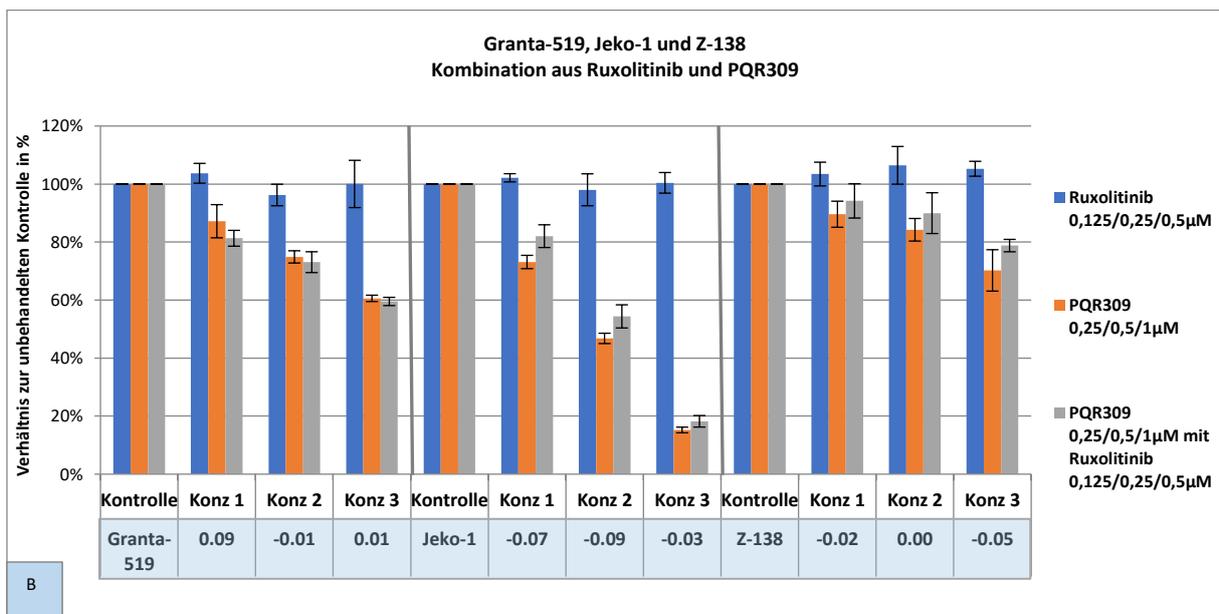
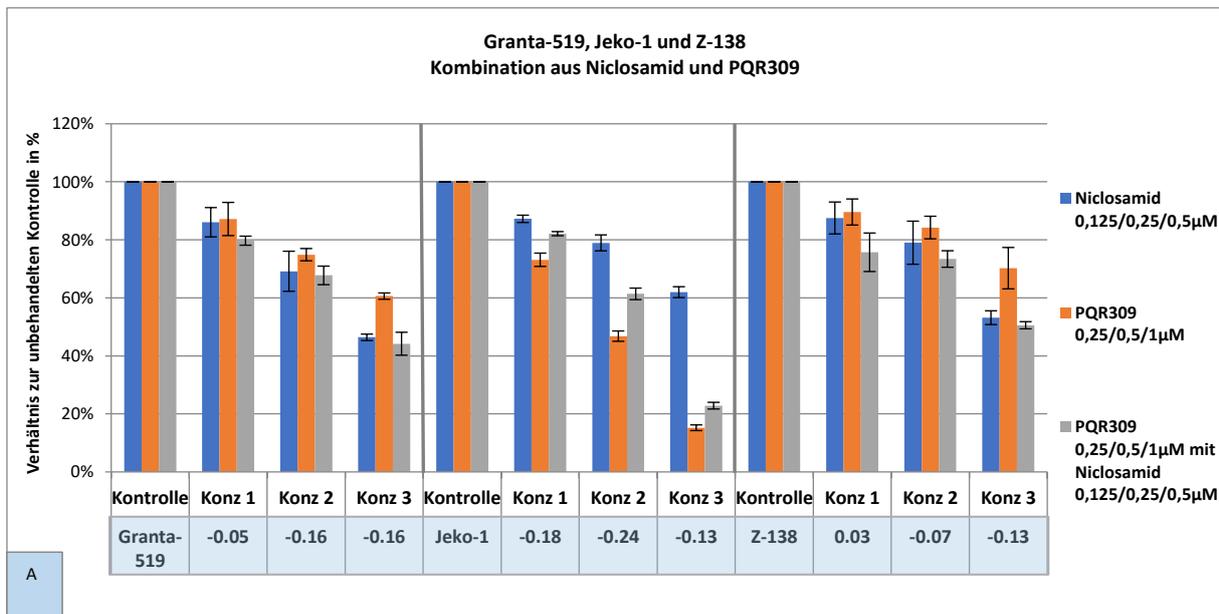


Abbildung 9 (A, B): MCL-Zelllinien Granta-519, Jeko1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit Niclosamid (A), Ruxolitinib (B) sowie Kombination der Therapeutika mit PRQ309 nach Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden. Die abgebildeten Werte jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen und im Verhältnis der behandelten Zellen zu unbehandelter Kontrolle. Die untere Zeile zeigt Fractions of product-Werte: „> +0.1“ synergistisch, zwischen „0.1 und -0.1“ additiv, „< -0.1“ antagonistisch

Nach Zugabe des RSK-Inhibitors SL0101 bei niedrigen Konzentrationen konnten bei Jeko-1 zuerst antagonistische und bei höheren Konzentrationen synergistische Effekte festgestellt werden (Abbildung 10, A). Die Kombination aus PQR309 mit Ibrutinib wirkte sich additiv auf Granta-519 aus. Mit der Zelllinie Jeko-1 zeigte sich ein deutlicher

Synergieeffekt der beiden Substanzen, wobei bereits PQR309 in der Monotherapie die Zellzahl auf ca. 30% reduzieren konnte (Abbildung 10, B).

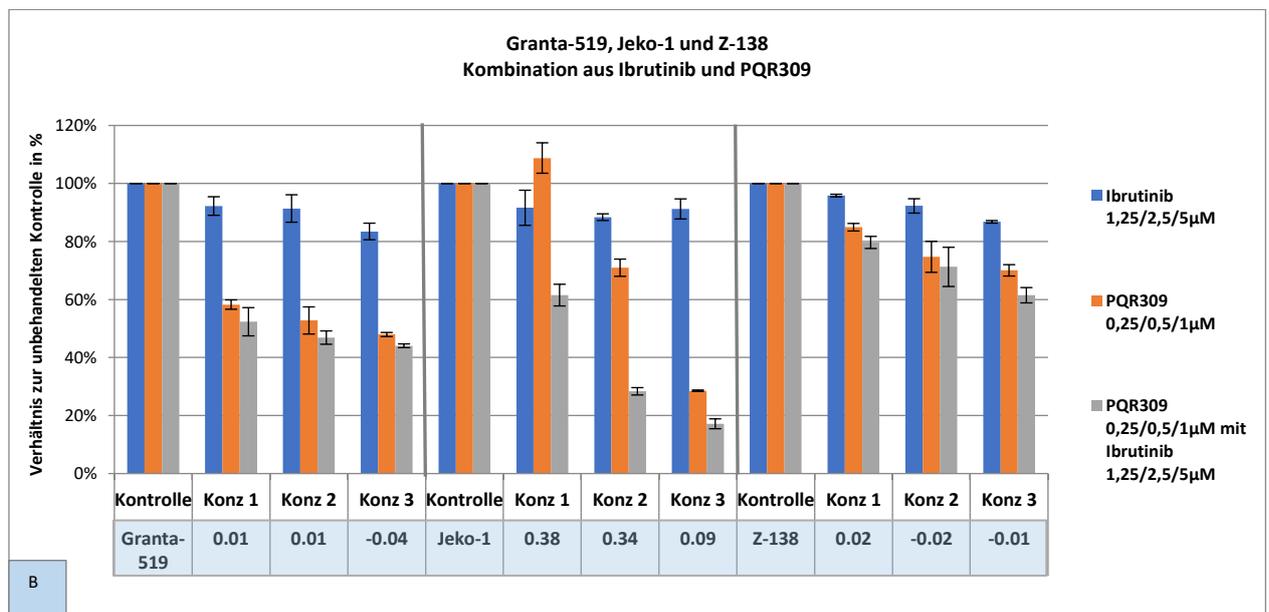
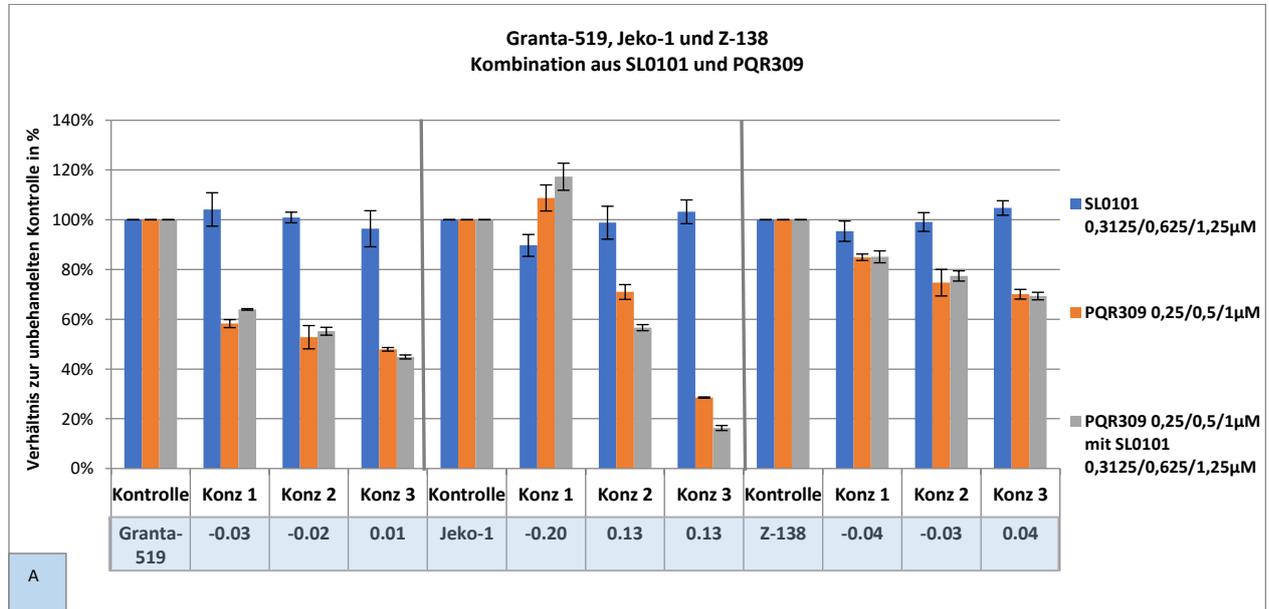
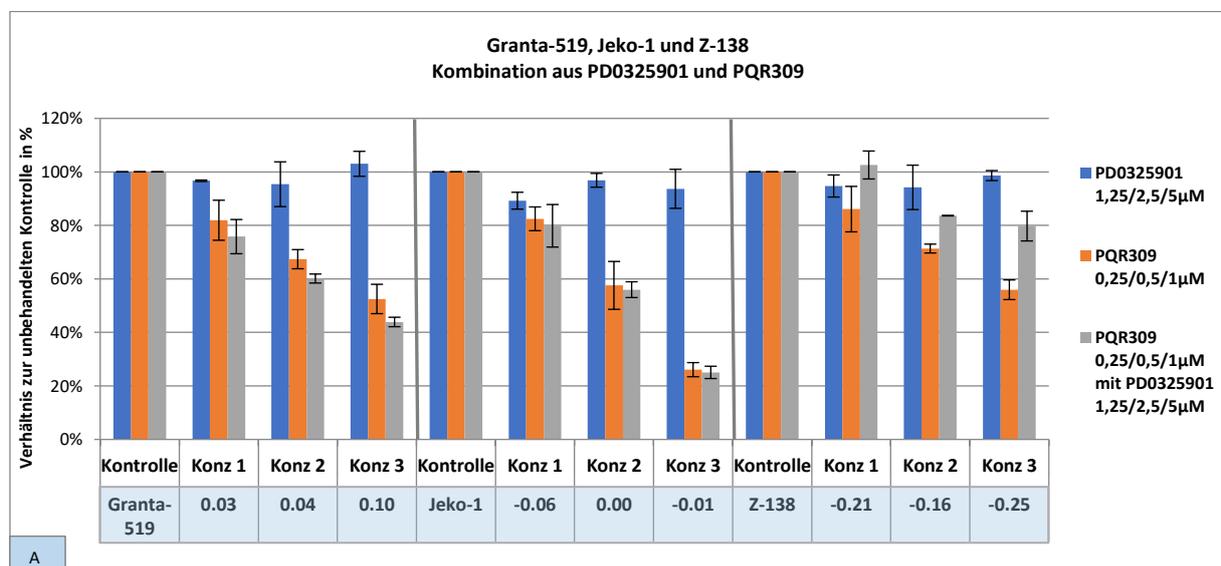


Abbildung 10 (A, B): MCL-Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit SL0101 (A) und Ibrutinib (B) sowie Kombination der Therapeutika mit PRQ309 nach Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden. Die abgebildeten Werte jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen und im Verhältnis der behandelten Zellen zu unbehandelter Kontrolle. Die untere Zeile zeigt Fractions of product-Werte: „> +0.1“ synergistisch, zwischen „0.1 und -0.1“ additiv, „< -0.1“ antagonistisch

Nach Behandlung der Granta-519, Jeko-1 und Z-138-Zelllinien mit PQR309 und ABT199 konnten beträchtliche Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber ausgewählten Konzentrationen erkannt werden (Abbildung 11, B). So zeigte die Kombination von PQR309 und ABT199 bei Granta-519 und Z-138 einen additiven Effekt, während Jeko-1 sich gegenüber ABT199 als resistent erwies, d.h., dass es bei Jeko-1 selbst bei einer ABT-Konzentration von 1 μ M zu keiner erkennbaren Zellzahlreduktion kam. Bei Granta-519 und Z-138 verringerte sich hingegen die Zellzahl bereits in nM-Konzentrationsbereich.

Jeko-1 und Z-138 lieferten antagonistische Effekte gegenüber einer kombinierten Therapie von PD0325901 und PQR309 in allen Konzentrationen. Lediglich Granta-519 zeigte dagegen eine additive Wirkung. Eine Kombination mit Bortezomib erzielte abhängig von der eingesetzten Zelllinie und Auswahl der Konzentration sehr heterogene Resultate (Abbildung 11, A und C). Die Monobehandlung von Jeko-1 und Z-138 mit Bortezomib zeigte keinen hemmenden Effekt auf die Zellproliferation. Auch bei Granta-519 konnte kaum antiproliferative Wirkung detektiert werden.



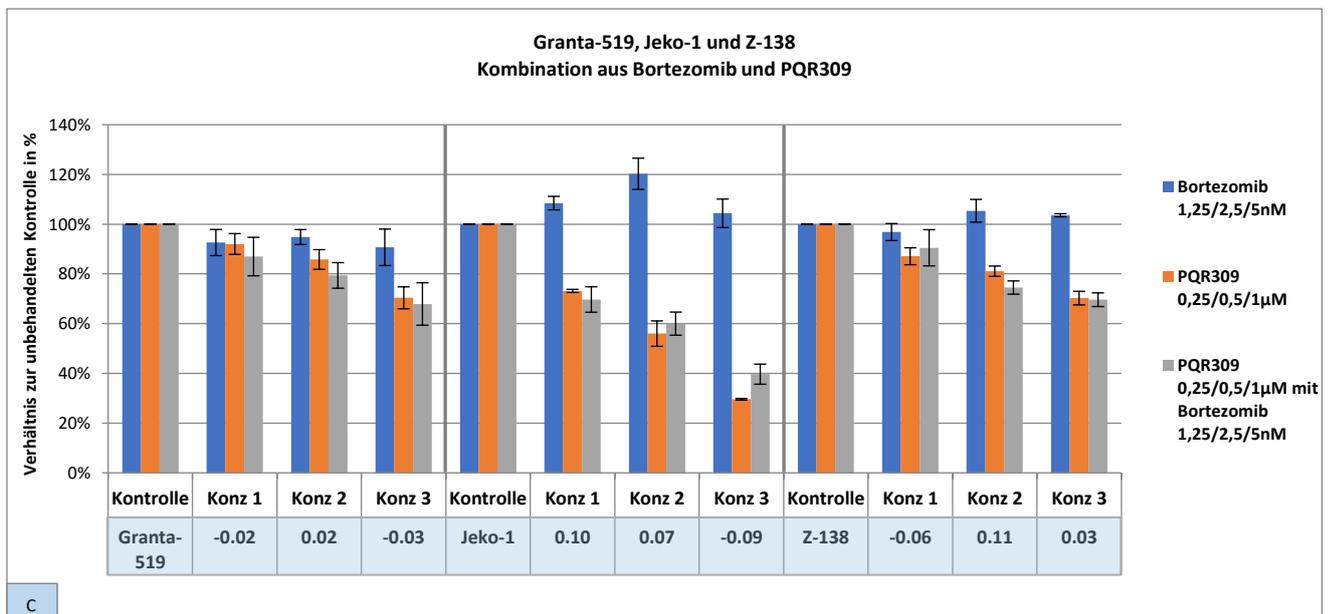
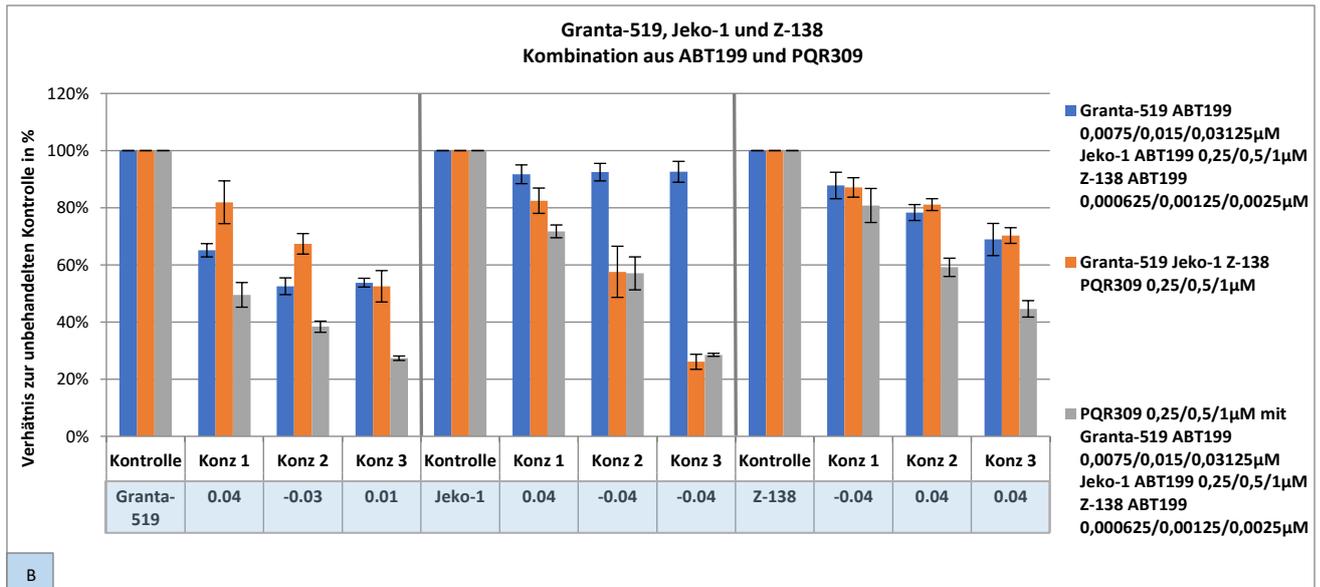


Abbildung 11 (A, B, C): Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit PD0325901 (A), ABT199 (B), Bortezomib (C) sowie Kombination der Therapeutika mit PRQ309 nach Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden. Die abgebildeten Werte jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen und im Verhältnis der behandelten Zellen zu unbehandelter Kontrolle. Die untere Zeile zeigt Fractions of product-Werte: „> +0.1“ synergistisch, zwischen „0.1 und -0.1“ additiv, „< -0.1“ antagonistisch

Bei der Kombination von PQR309 und dem BET-Inhibitor JQ1 präsentierte sich ein mit zunehmender Konzentration ansteigender synergistischer Effekt bei Jeko-1 und Z-138 (Abbildung 12). Die Zugabe von JQ1 zu PQR309 hatte jedoch bei Granta-519 keinen zusätzlichen proliferationsinhibierenden Effekt.

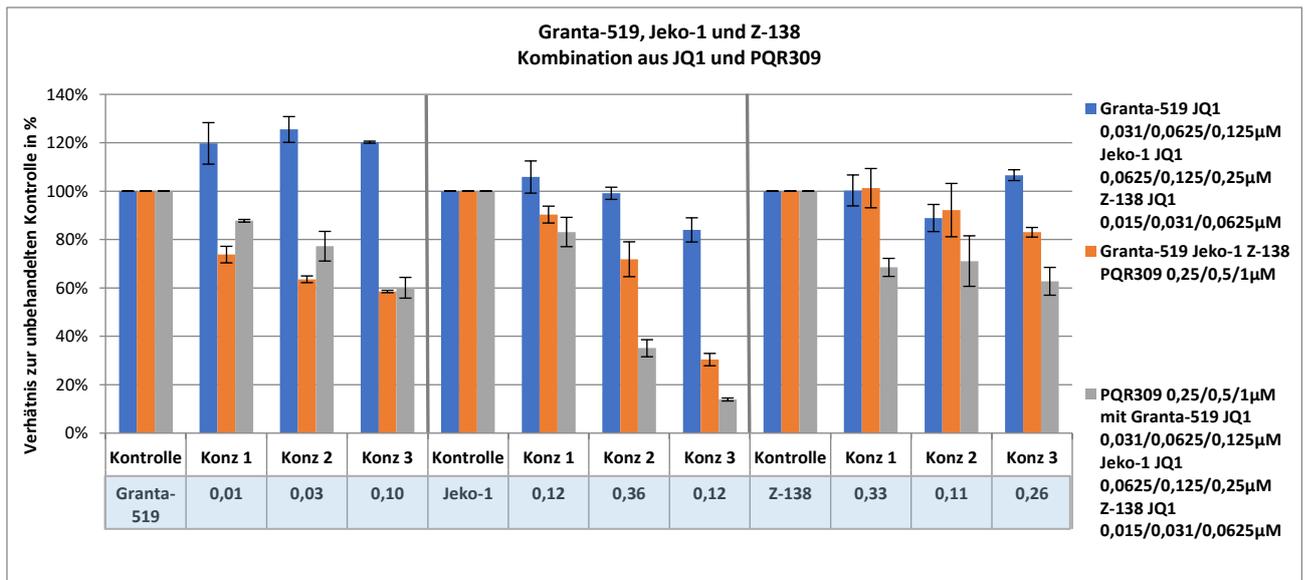


Abbildung 12: Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit JQ1 sowie Kombination mit PQR309 nach Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden. Die abgebildeten Werte jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen und im Verhältnis der behandelten Zellen zu unbehandelter Kontrolle. Die untere Zeile zeigt Fractions of product-Werte: „> +0.1“ synergistisch, zwischen „0.1 und -0.1“ additiv, „< -0.1“ antagonistisch

5.1.4 PQR309 und PIM1-Kinase-Inhibitor

Die stärkste Synergie konnte unter der Kombination aus PQR309 und AZD1208 bei Jeko-1 und Z-138 beobachtet werden. Mit steigender Konzentration stieg auch die Wirkung dieser Kombination auf Granta-519 an. Interessanterweise löste die Monotherapie mit AZD1208 eine Proliferation von Granta-519-Zellen aus (Abbildung 13).

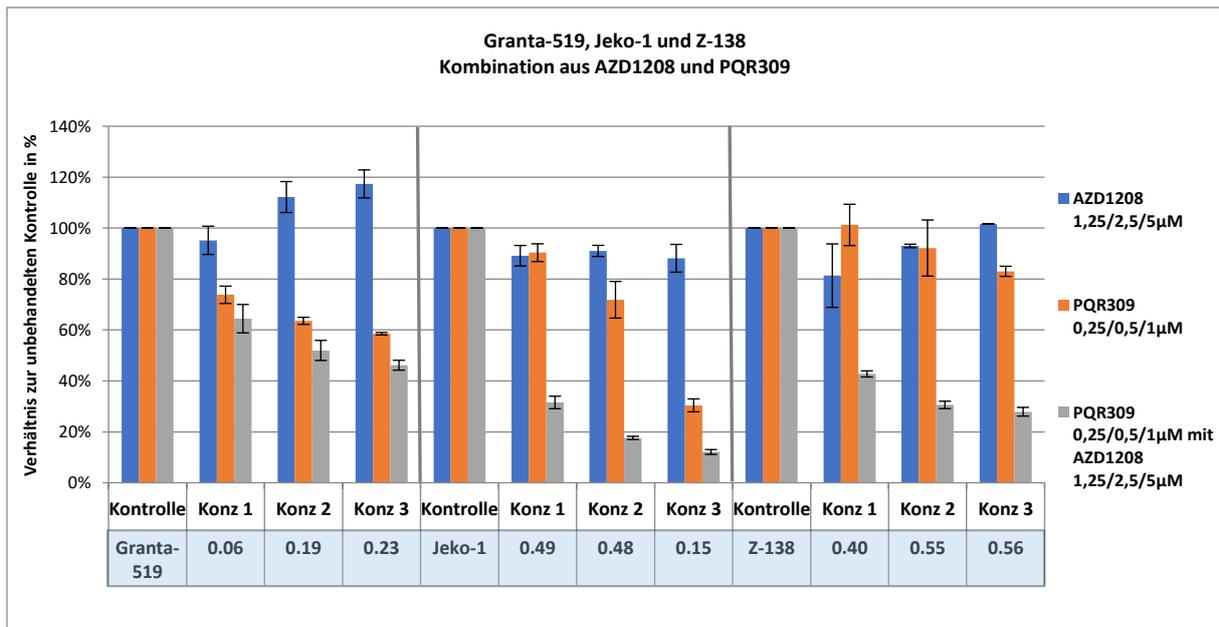


Abbildung 13: Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit AZD1208 sowie Kombination mit PRQ309 nach Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden. Die abgebildeten Werte jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen und im Verhältnis der behandelten Zellen zu unbehandelter Kontrolle. Die untere Zeile zeigt Fractions of product-Werte: „> +0.1“ synergistisch, zwischen „0.1 und -0.1“ additiv, „< -0.1“ antagonistisch

Um die Auswirkungen der einzelnen Komponenten darzustellen, wurde Granta-519, Jeko-1 und Z-138 in Monotherapie mit CAL101, KU0063794 sowie in Kombination mit AZD1208 inkubiert. Auch die Kombination von AZD1208 mit CAL101 oder KU0063794 hatte bei allen drei Zelllinien einen synergistischen inhibierenden Effekt auf die Zellproliferation. In Monotherapie wirkten sich CAL101, KU0063794 und AZD1208 in gewählten Konzentrationen unwesentlich auf die Proliferation der Zelle aus (Abbildung 14).

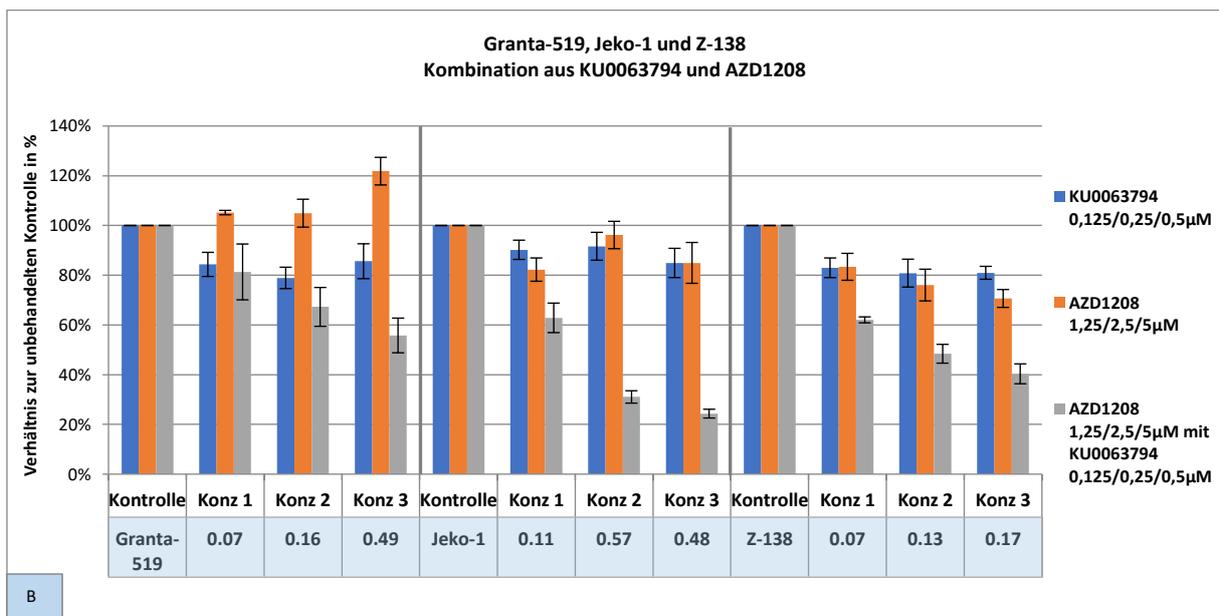
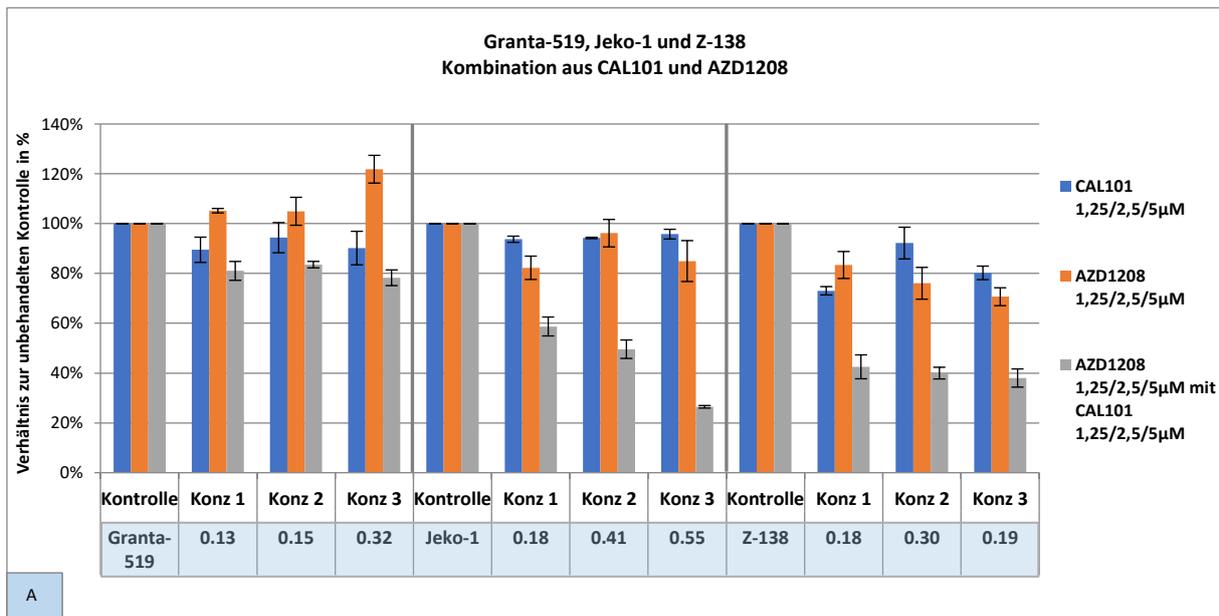


Abbildung 14 (A, B): Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit AZD1208 sowie Kombination mit PRQ309 nach Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden. Die abgebildeten Werte jeweils als Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen und im Verhältnis der behandelten Zellen zu unbehandelter Kontrolle. Die untere Zeile zeigt Fractions of product-Werte: „> +0.1“ synergistisch, zwischen „0.1 und -0.1“ additiv, „< -0.1“ antagonistisch

5.2 Zellzyklus- und Apoptoseanalyse von PQR309

5.2.1 Zellzyklusanalyse

Die Auswirkung der PQR309-Behandlung auf den Zellzyklus wurde bei Granta-519, Jeko-1 und Z-138 untersucht (Abbildung 15). Während die PQR309-Behandlung bei Jeko-1 bereits bei einer Konzentration von 0,0625 μM zu einer signifikanten Reduktion des Zellanteils in der S-Phase führte, kam es bei Granta-519 und Z-138 zu geringer Wirkung auf den Zellzyklus erst nach Behandlung mit 1 μM PQR309, bei gleichzeitiger Zunahme des Zellanteils in der G1-Phase im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

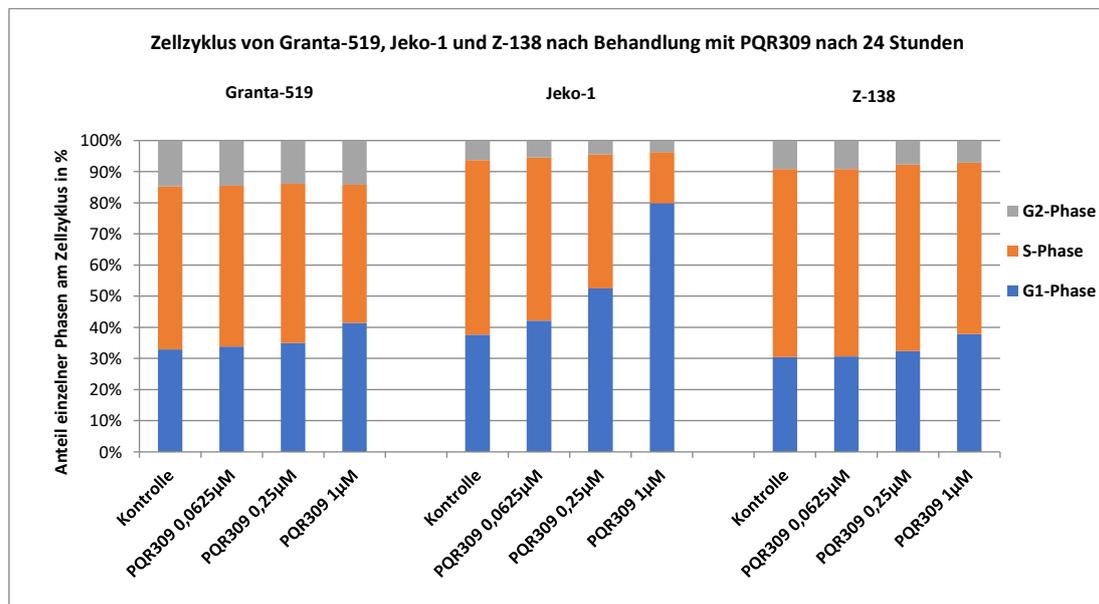


Abbildung 15: Phasen des Zellzyklus der Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung mit PQR309; Färbung mittels Propidiumiodid und FACS-Analyse nach 24 Stunden

In einem nächsten Schritt wurden Granta-519, Jeko-1 und Z-138 in Monotherapie mit CAL101, Temsirolimus, KU0063794 und einer Kombination aus CAL101 und Temsirolimus sowie CAL101 und KU0063794 behandelt, um die Wirksamkeit dieser Substanzen auf den Zellzyklus zu bestimmen. Eine Monotherapie mit CAL101 und Temsirolimus sowie deren Kombination zeigten keinen Zellzykluseffekt auf keine der getesteten MCL-Zellen. Erst eine Monotherapie mit dualem mTOR-Inhibitor KU0063794 sowie eine Kombination aus CAL101 und KU0063794 lieferte dem PQR309-Inhibitor ähnliche Ergebnisse auf den Zellzyklus. Vergleichbar zur Monotherapie mit PQR309 nahm bei Jeko-1 bereits nach Zugabe von doppeltem mTOR-Inhibitor KU0063794 der Zellanteil der S-Phase deutlich ab und der der G1-Phase zu. Der Effekt konnte durch die Kombination aus CAL101 und KU0063794

zusätzlich gesteigert werden. Jeko-1 präsentierte sich dabei als die sensitivste MCL-Zelllinie. Ähnlich wie bei PQR309-Behandlung konnte Monotherapie mit KU0063794 sowie Kombination von CAL101 und KU0063794 bei Granta-519 und Z-138 nur eine geringe Zunahme der Zellen in der G1-Phase bei gleichzeitiger Abnahme in der S-Phase auslösen (Abbildung 16).

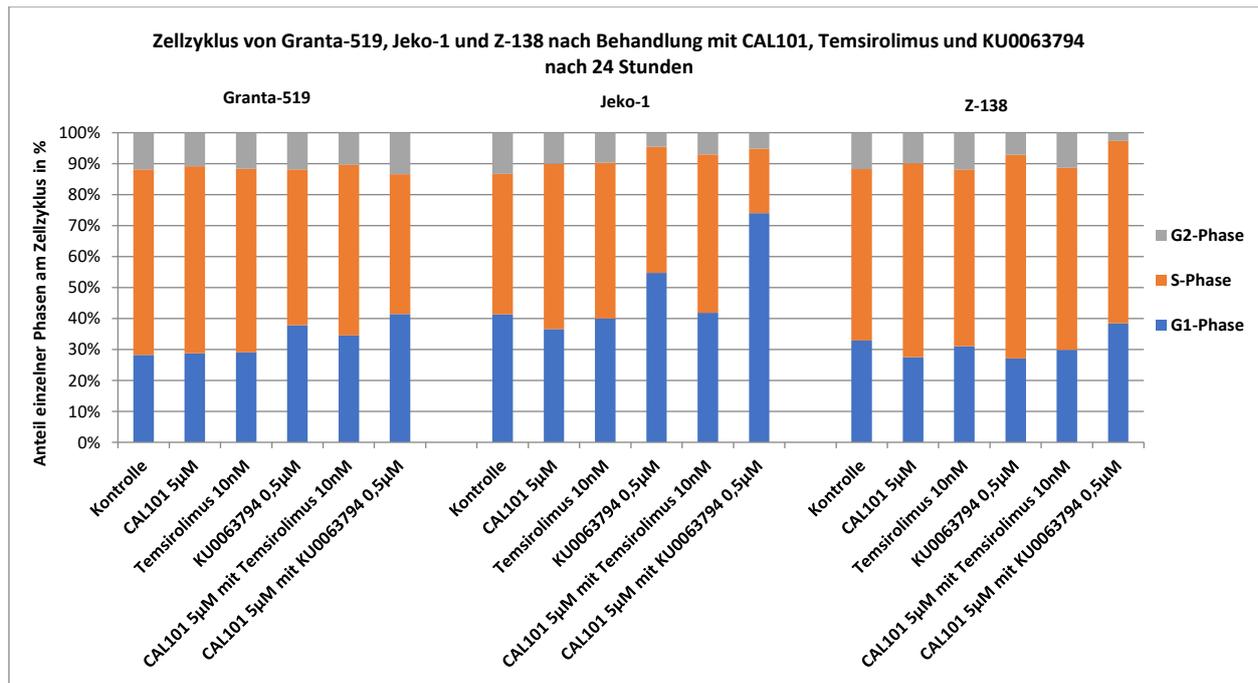


Abbildung 16: Phasen des Zellzyklus der Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit CAL101, Temozolomid und KU0063794 sowie deren Kombination; Färbung mittels Propidiumiodid und FACS-Analyse nach 24 Stunden

Um beurteilen zu können, wie sich die Kombination von PQR309 mit AZD1208 auf den Zellzyklus der MCL-Zellen auswirkt, wurden Granta-519-Zellen mit den Monosubstanzen PQR309 und AZD1208 in den Konzentrationen 0,0625 µM und 0,25 µM sowie 0,3125 µM und 1,25 µM entsprechend behandelt (Abbildung 17). Dabei zeigte sich in der Kombinationsbehandlung sowohl bei niedriger als auch höherer Konzentration ein synergistischer Effekt auf den Anteil der Granta-519-Zellen in der S- (Reduktion) und G1-Phase (Erhöhung).

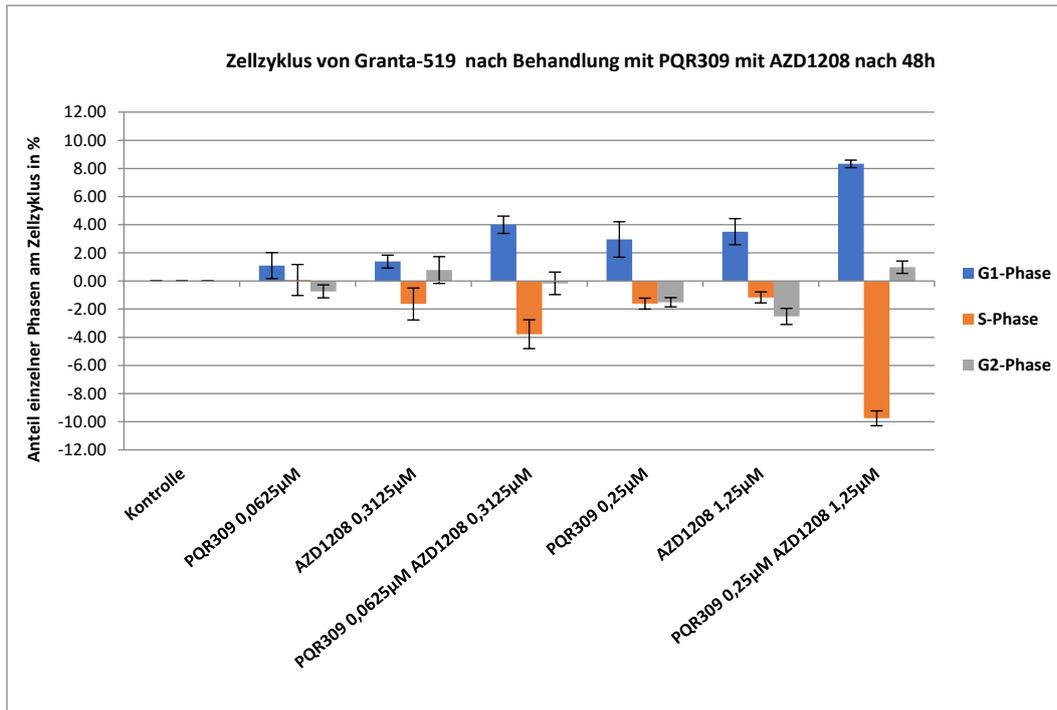


Abbildung 17: Phasen des Zellzyklus der Zelllinie Granta-519 nach Behandlung in Monotherapie mit PQR309 und AZD1208 sowie deren Kombination; Färbung mittels Propidiumiodid und FACS-Analyse nach 48 Stunden.

5.2.2 Apoptose

Da der Trypanblau-Ausschlusstest keine genaue Aussage über die Zahl der apoptotischen Zellen ermöglicht, wurden die MCL-Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 einer Apoptose-Analyse mittels FACS unterzogen. Dabei konnte nur bei einer Konzentration von 1 µM PQR309 ein leichter Anstieg des Annexin V positiven, 7-AAD negativen Zellanteils in der frühen Phase der Apoptose bei allen drei Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 18).

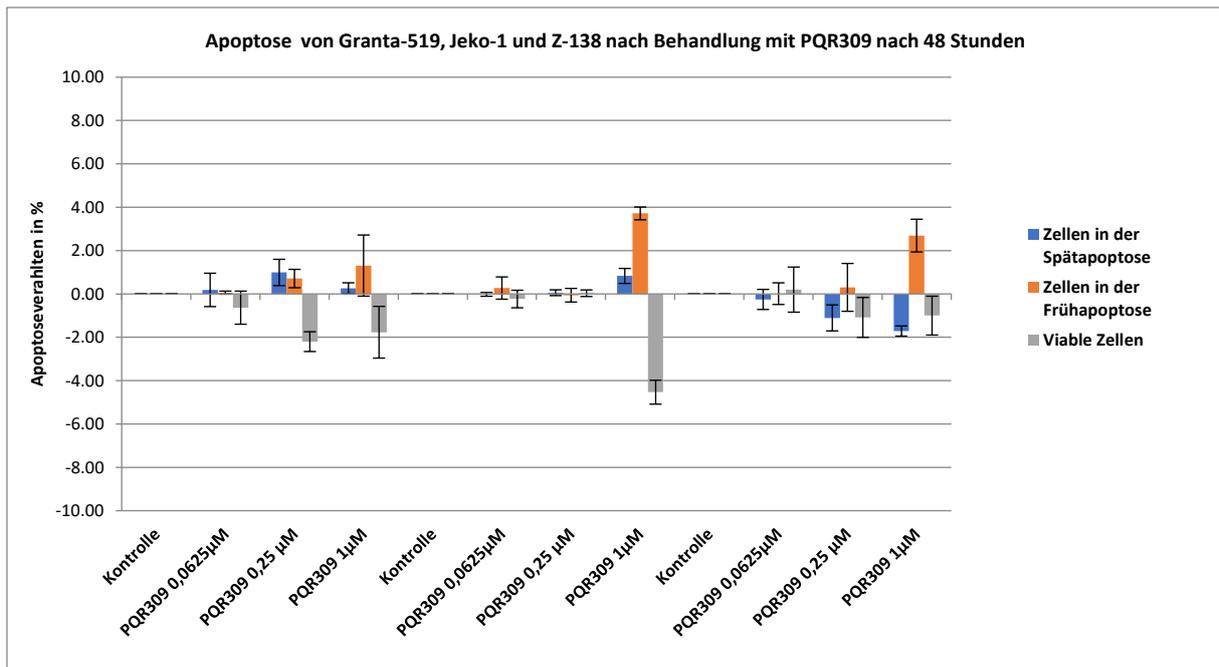


Abbildung 18: Apoptose der Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung mit PQR309; Färbung mittels Annexin und 7AAD und FACS-Analyse nach 48 Stunden.

Bei allen drei Zelllinien kam es ebenfalls zu keinem wesentlichen Anstieg des Zellanteils in früher Apoptose nach Behandlung sowohl mit einzelnen Substanzen CAL101, Temsirolimus und KU0063794, als auch bei Kombination aus CAL101 und Temsirolimus sowie CAL101 mit KU0063794 (Abbildung 19).

Apoptose von Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung mit CAL101, Temsirolimus und KU0063794 nach 48 Stunden

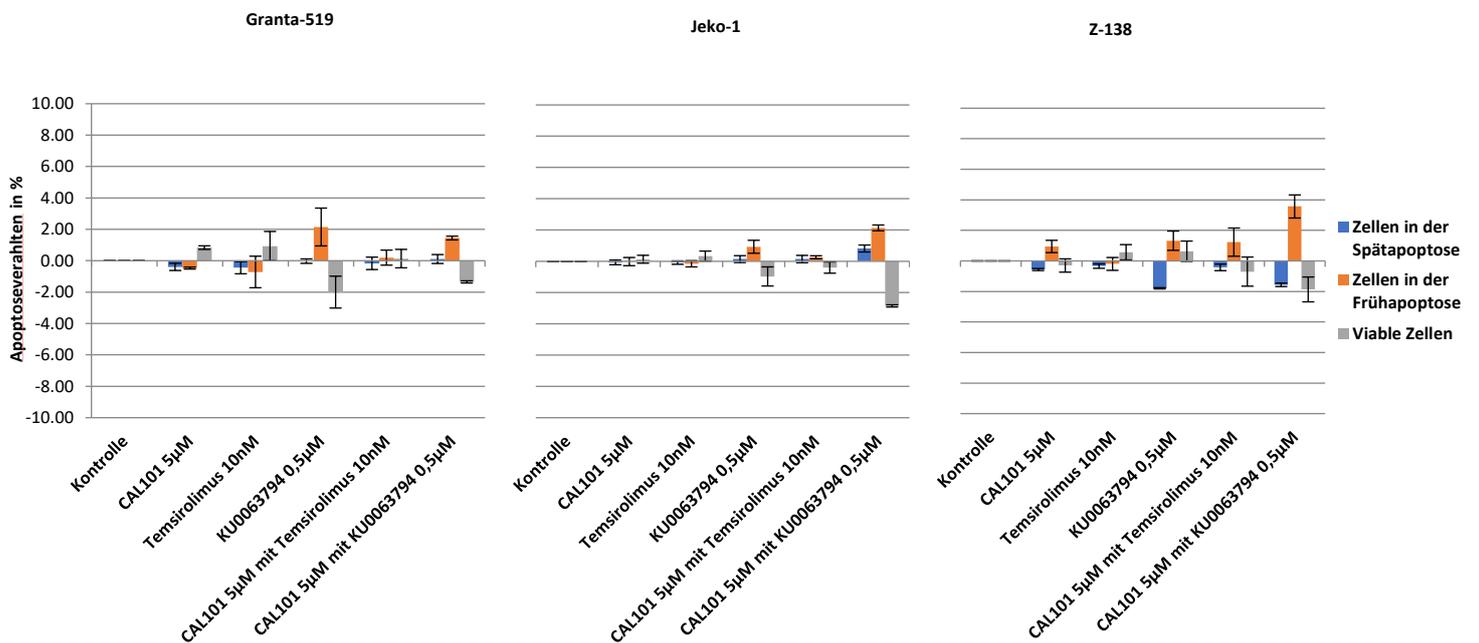


Abbildung 19: Apoptose der Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit CAL101, Temsirolimus und KU0063794 sowie deren Kombination; Färbung mittels Annexin und 7AAD und FACS-Analyse nach 48 Stunden.

Ebenfalls konnte kein apoptotischer Effekt bei Kombination von PQR309 und AZD1208 der Zelllinie Granta-519 nachgewiesen werden (Abbildung 20).

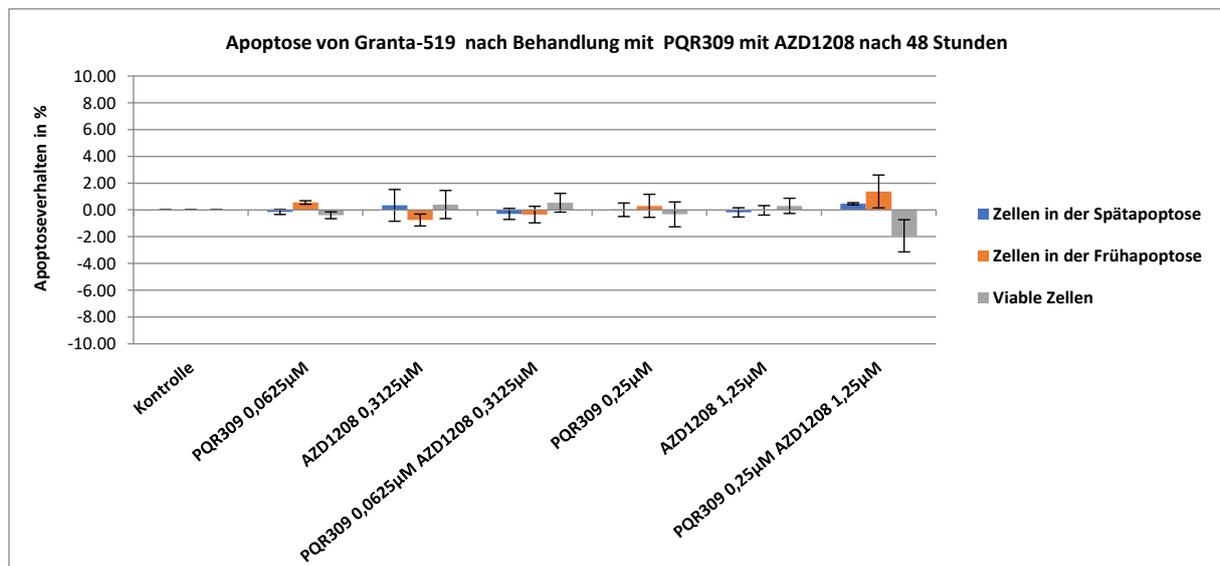


Abbildung 20: Apoptose der Zelllinie Granta-519 nach Behandlung in Monotherapie mit PQR309 und AZD1208 sowie deren Kombination; Färbung mittels Annexin und 7AAD und FACS-Analyse nach 48 Stunden.

5.3 Proteinexpression unter Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren

Zur Untersuchung der Wirkung der verwendeten Inhibitoren auf die Proteinexpression der MCL-Zelllinien wurde die Western Blot-Analyse verwendet. Dazu wurden die MCL-Zelllinien in Mono- und Kombinationstherapie für 24 Stunden behandelt und anschließend aus ihnen Proteine extrahiert. Mittels Western Blot wurden gezielt die Proteine des B-Zell-Rezeptor-Signalweges (ph.AKT, ph.mTORC1, ph.mTORC2, ph.Raptor, ph.Rictor, ph.44/42 MAPK, ph.MEK1/2, ph.RB, BP1, ph.BP1) untersucht. Nach 24-stündiger Behandlung von Granta-519, Jeko-1 und Z-138 mit PQR309 in den Konzentrationen von 0,0625, 0,25 und 1 μM wurde der Expressions- und Phosphorylierungsstatus der Proteine mittels Western Blot ermittelt. Es zeigte sich eine dosisabhängige Dephosphorylierung von AKT an Serin473- sowie Threonin308. Bereits nach 0,0625 μM und nach 1 μM konnte die Phosphorylierung von ph.AKT vollständig gehemmt werden (Abbildung 21). Während für ph.Rictor schon nach einer Gabe von 0,0625 μM eine Dephosphorylierung detektierbar war, konnte diese für ph.Raptor, ph.mTORC1 und ph.mTORC2 erst bei einer PQR309-Konzentration von 0,25-1 μM festgestellt werden. Am empfindlichsten reagierten dabei die Zelllinien Granta-519 und Jeko-1 auf das Therapeutikum. Die Behandlung der Zelllinien mit PQR309 führte zudem zur Dephosphorylierung von Proteinen aus dem MAPK-Signalweg. Die stärkste Dephosphorylierung konnte dabei für ph.MEK verzeichnet werden, gefolgt von ph44/42MAPK sowie ph.RSK. Trotz nachgewiesenem Zellzyklusarrest durch PQR309 und dadurch erwartetem Einfluss auf den ph.Rb-Status konnte nur eine sehr schwache Dephosphorylierung von ph.Rb bei Granta-519 gezeigt werden. Bei Jeko-1 und Z-138 konnte eine deutliche Abnahme des phosphorylierten Proteingehalts nach 1 μM detektiert werden. Die Proteinexpression von Zyklin D1 wurde durch PQR309 nicht beeinträchtigt.

Proteinanalyse von Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung mit PQR309 nach 24 Stunden

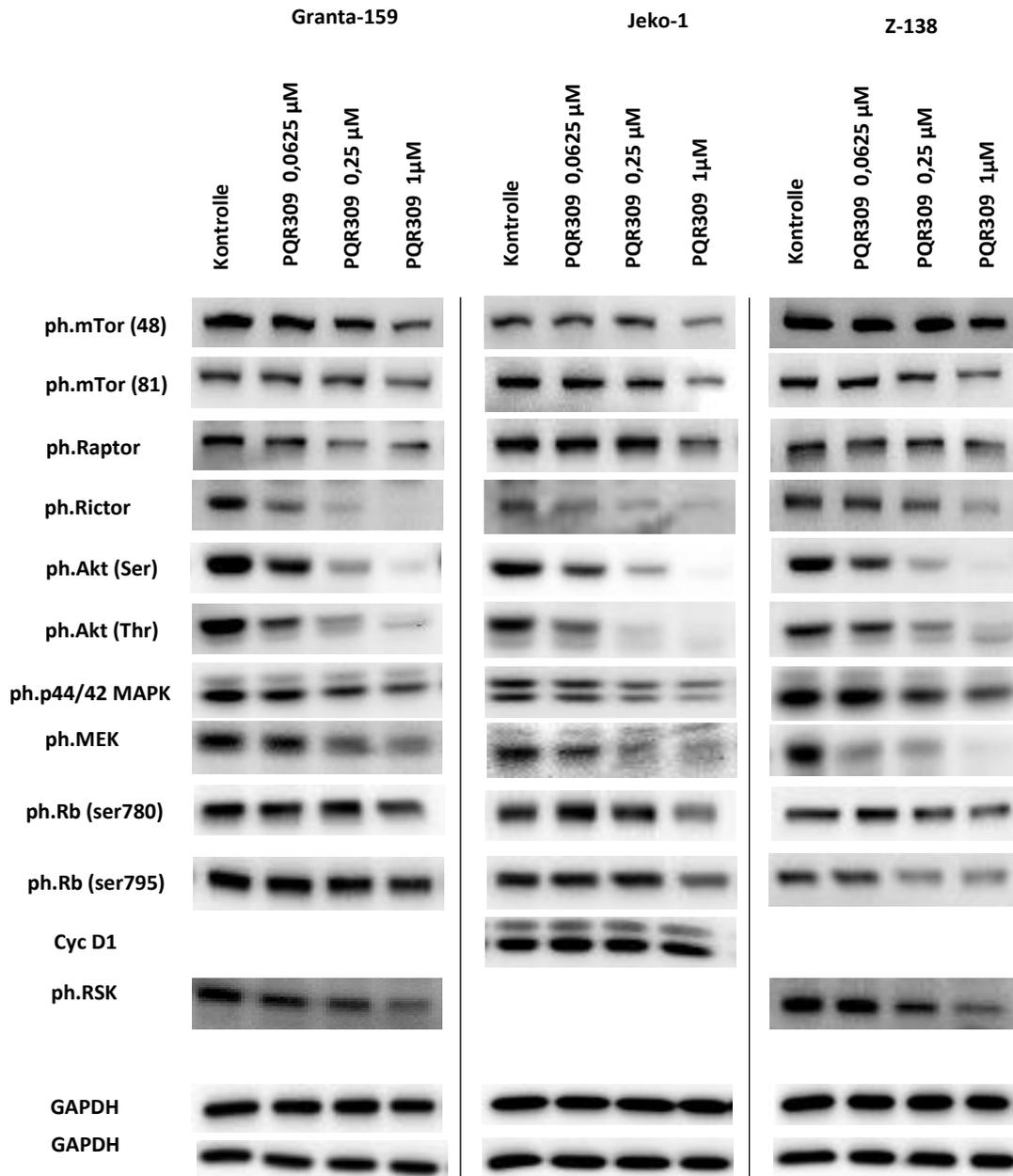


Abbildung 21: Analyse der Proteinexpression der Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung mit PQR309 nach 24 Stunden mittels Western Blot.; GAPDH-Kontrolle.

Um festzustellen, zu welchem Zeitpunkt die Intensität der Proteinexpression des B-Zell-Rezeptor-Signalweges nach PQR-Behandlung am stärksten betroffen ist, wurde eine kinetische Untersuchung angewendet. Nach Behandlung von Granta-519-Zellen mit PQR309 wurden Proteine nach 1, 4, 8 und 24 Stunden extrahiert (Abbildung 22). Die Behandlung der Zellen mit 0,25 µM PQR309 führte bereits nach einer Stunde zu

einer Reduktion von ph.AKT, ph.Rictor, ph.MAPK und ph.MEK. Die beiden ph.mTOR-Komplexe, sowie ph.Raptor reagierten nicht auf die verwendeten Konzentrationen.

Proteinanalyse von Granta-519 nach Behandlung mit PQR309

Zeitkinetik

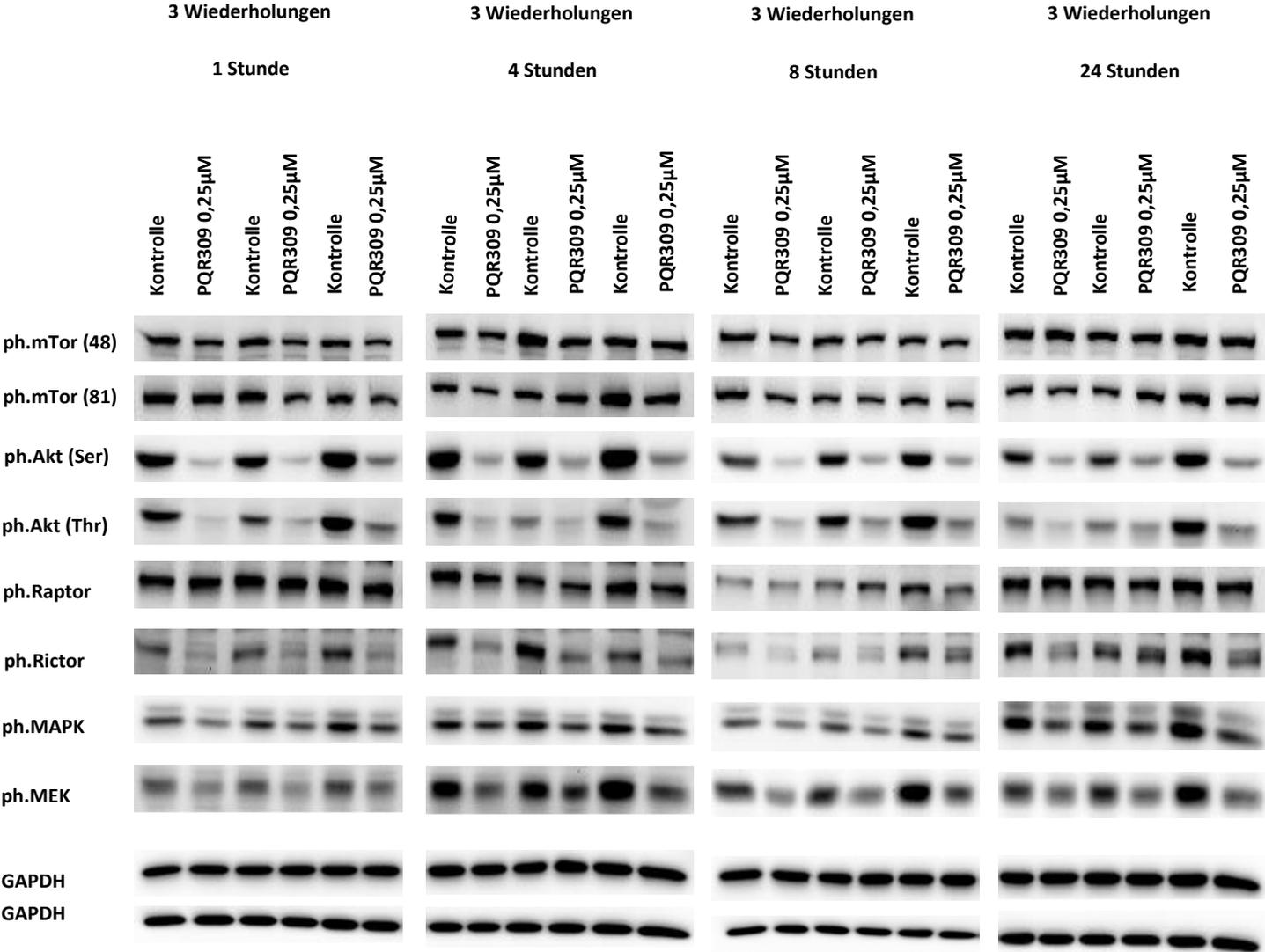


Abbildung 22: Analyse der Proteinexpression in zeitlichem Verlauf von Granta-519 nach Behandlung mit PQR309 nach 1, 4, 8 und 24 Stunden in drei Wiederholungen mittels Western Blot.; GAPDH-Kontrolle.

Um herauszufinden, welche Komponenten des Inhibitors PQR309 für dessen stärkere Wirkung auf MCL-Zellen als die Einzelinhibitoren verantwortlich sind, wurde die Wirkungsweise der einzelnen Inhibitoren CAL101, Temsirolimus und KU0063794 sowie deren Kombination auf Proteinebene untersucht. Dazu wurde Granta-519 mit CAL101, Temsirolimus, KU0063794 und Kombinationen CAL101 und Temsirolimus sowie CAL101 und KU0063794 für 24 Stunden behandelt, bevor die Proteine extrahiert und analysiert wurden. Nach Behandlung mit 5 μ M CAL101 kam es, wie erwartet, zu einer Verminderung der Phosphorylierung von ph.Akt und ph.MEK (Abbildung 23). Temsirolimus konnte in der gewählten Konzentration von 10 nM keine nennenswerte Suppression der getesteten Proteine bewirken. Die Kombination aus CAL101 und Temsirolimus wirkte sich ausschließlich auf ph.AKT Threonin308-Stelle und ph.MEK aus, was sich nicht von dem Effekt von CAL101 in Monotherapie unterschied. KU0063794 führte zur Dephosphorylierung von ph.AKT Serin473-Stelle, ph.mTORC2 und in geringem Maß von ph.mTORC1. Die Reduktion von ph.Rictor und ph.MEK durch KU0063794 war dagegen ausgeprägt. Die Kombination von CAL101 und KU0063794 führte zu einem ähnlichen Grad an Dephosphorylierung von ph.AKT Serin473-Stelle, ph.Rictor, ph.Raptor, ph.MEK und ph.RSK wie auch die Einzelbehandlung mit KU0063794. Auf ph.AKT Threonin308-Stelle hatte die Kombination von CAL101 und Temsirolimus hingegen eine überaus starke dephosphorylierende Wirkung.

Proteinanalyse Granta-519 nach Behandlung mit CAL101, Temsirolimus und KU0063794 und deren Kombination

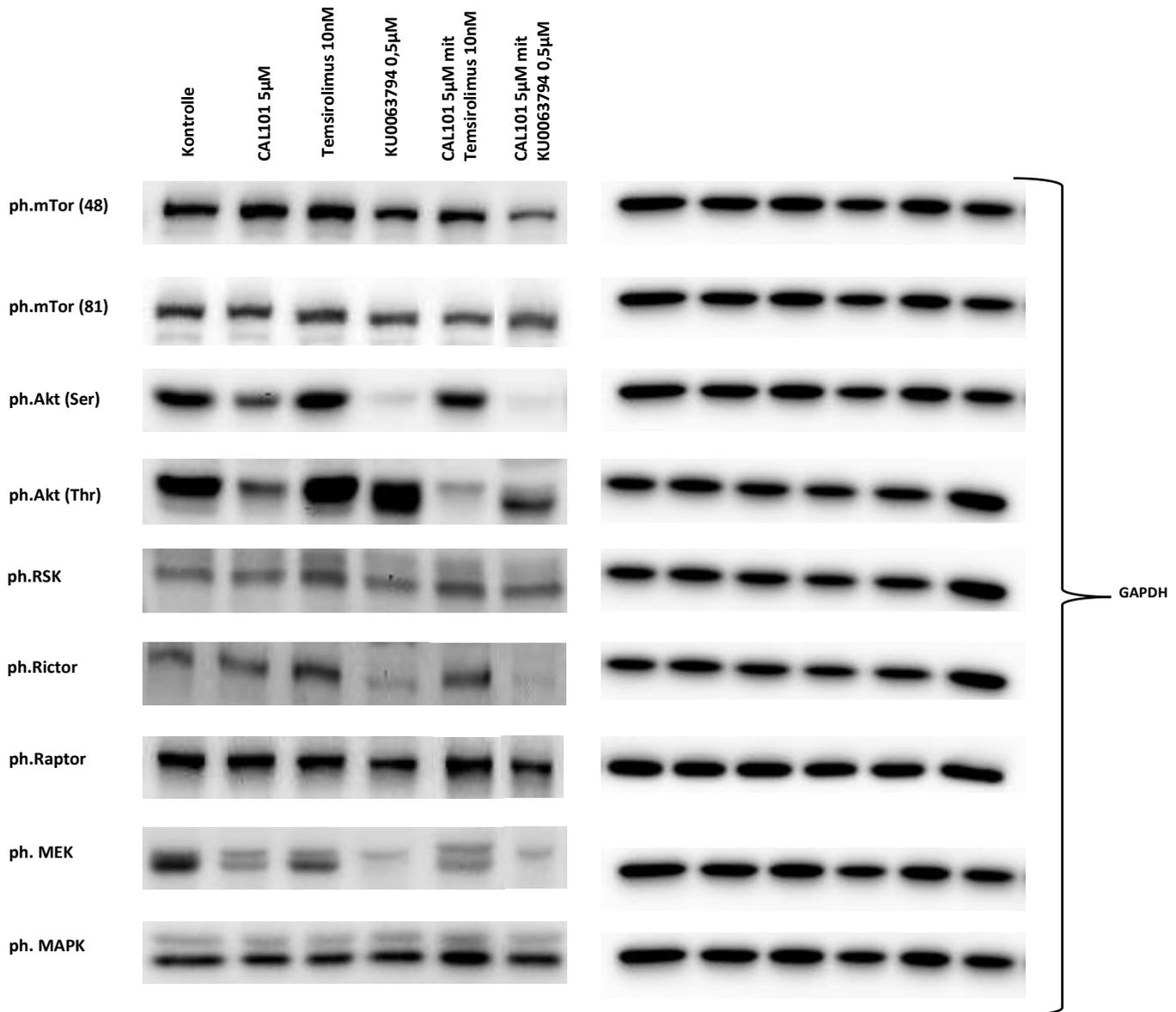


Abbildung 23: Analyse der Proteinexpression von Granta-519 nach Behandlung in Monotherapie mit CAL101, Temsirolimus und KU0063794 sowie deren Kombination nach 24 Stunden mittels Western Blot.; GAPDH-Kontrolle.

Da die Kombination aus PQR309 und AZD1208 einen starken Synergismus in den Vitalitäts- und Proliferationsassays aufwies, wurden auch die Proteine nach 24-stündiger Behandlung mit beiden Substanzen analysiert (Abbildung 24). AZD1208 in der gewählten Konzentration wies nach erstmaliger Behandlung keine Dephosphorylierung der getesteten Proteine auf. PQR309 zeigte wiederholt eine starke Minderung des ph.AKT-Anteils an beiden Phosphorylierungsstellen. Die

Kombination aus beiden Therapeutika führte zur Dephosphorylierung von ph.mTORC1 und ph.mTORC2, ph.Rictor, ph.MAPK, ph.MEK. Weiterhin ließen sich eine vermehrte Dephosphorylierung des ph.4EBP1 sowie eine Reduktion des Gesamtproteingehaltes nachweisen.

Proteinanalyse Granta-519 nach Behandlung mit PQR309 und AZD1208

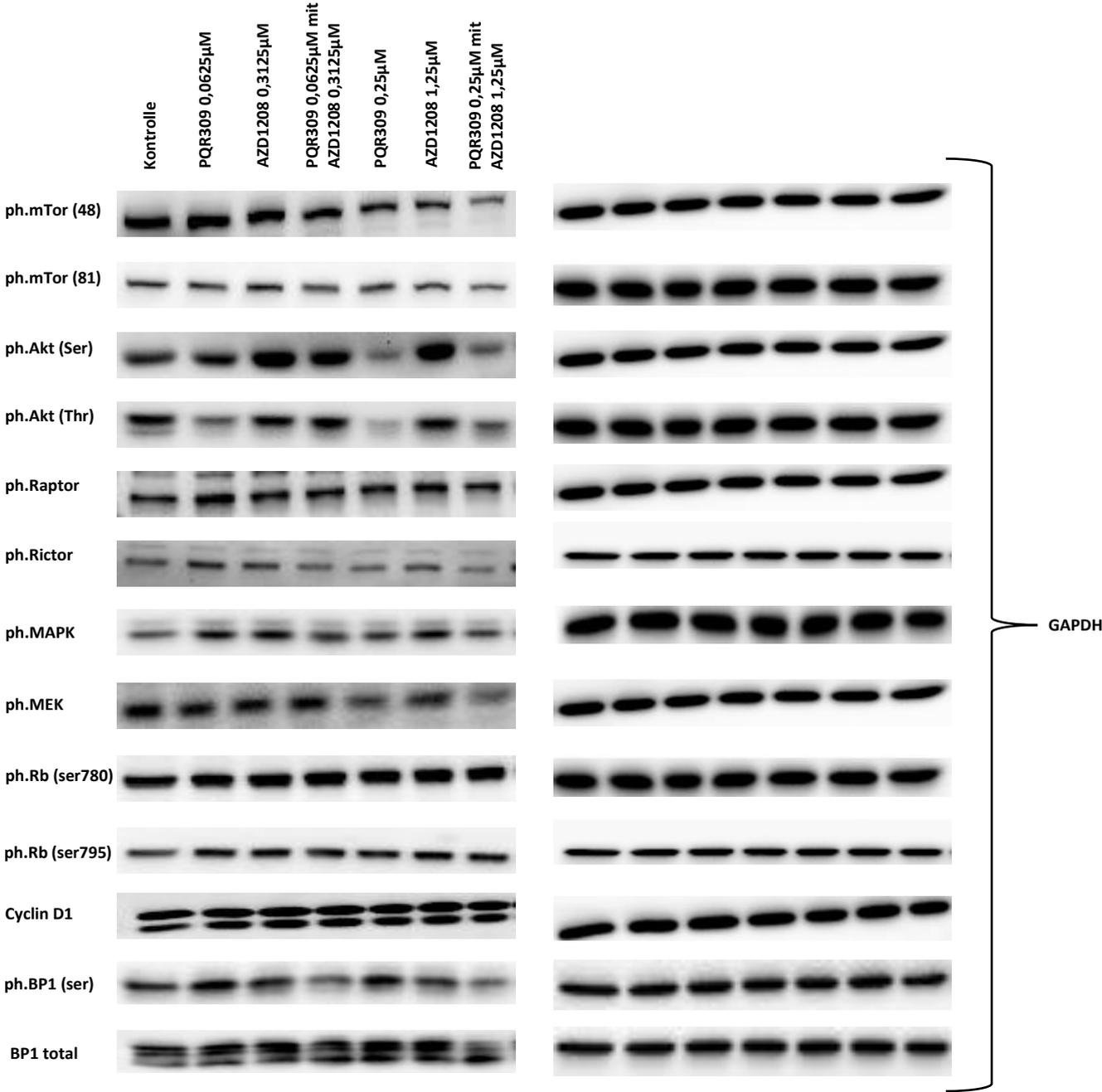


Abbildung 24: Analyse der Proteinexpression Zelllinie Granta-519 nach Behandlung in Monotherapie mit PQR309 und AZD1208 sowie deren Kombination nach 24 Stunden mittels Western Blot.; GAPDH-Kontrolle.

5.4 Seneszenzuntersuchung der Zelllinie Z-138

Die Zelllinie Z-138 als eine der sensitiven Zelllinien nach Behandlung mit PQR309 zeigte nach Analyse mittels Trypanblau-Ausschlusstest eine ausgeprägte Zellreduktion (Abbildung 25). Die Zellzyklusanalyse zeigte jedoch kaum dosisabhängige Reduktion des Anteils von Zellen in der S1- und G2-Phase (Abbildung 26, A). Auch der Anteil der apoptotischen Zellen erhöhte sich kaum dosisabhängig (Abbildung 26, B).

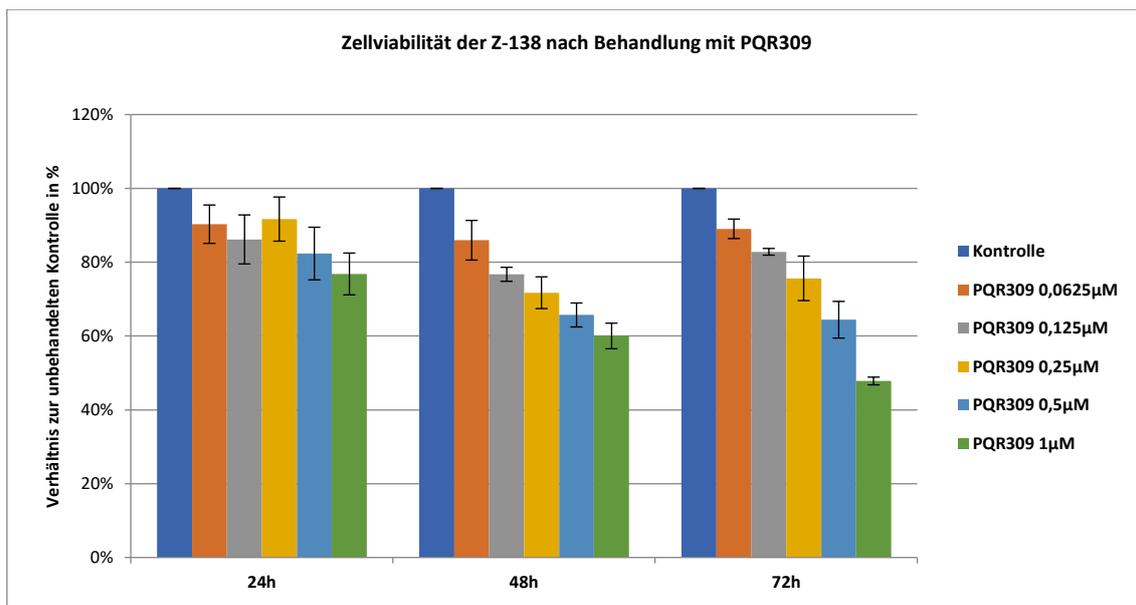


Abbildung 25: Zellviabilität der Z-138 nach Behandlung mit unterschiedlichen PQR309-Konzentrationen nach 24, 48 und 72 h mittels Vi-Cell-Methode

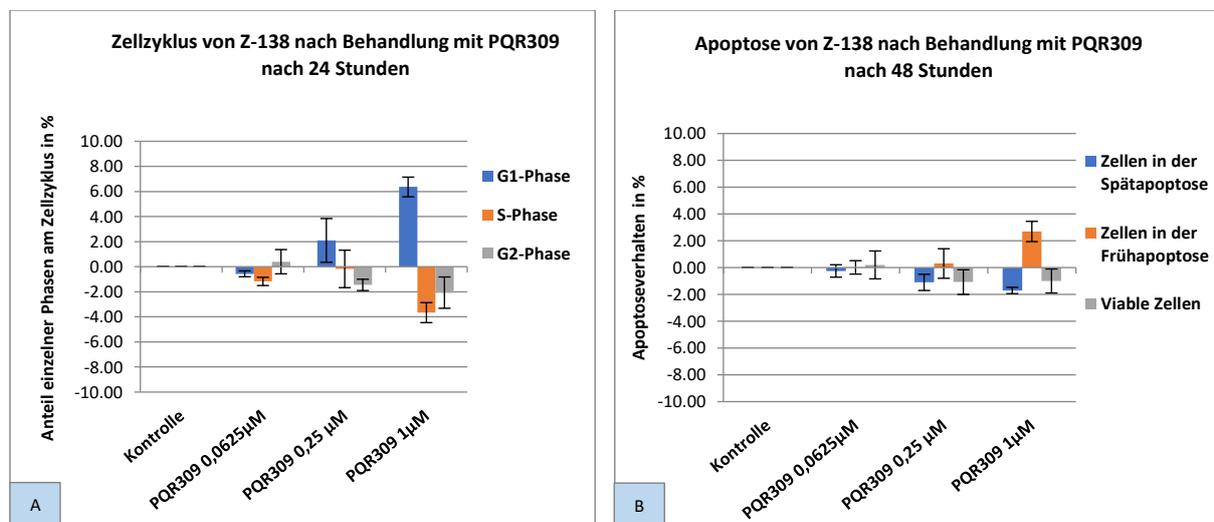


Abbildung 26: Anteil von Z-Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen (A) und Anteil apoptotischer Zellen (B) nach Behandlung mit unterschiedlichen PQR309-Konzentrationen

Um zu klären, ob diese Effekte der PQR309-Behandlung durch die mögliche Aktivierung der Zellseneszenz über den Zellzyklusinhibitor p21 vermittelt wurden, wurden die Mengen dieses Proteins nach Behandlung mit unterschiedlichen PQR309-Konzentrationen in Z-138- und Granta-519-Zellen untersucht. Es zeigte sich eine Reduktion der Proteinmenge in beiden Zelllinien in den Kulturen mit steigender PQR309-Konzentration (Abbildung 27).

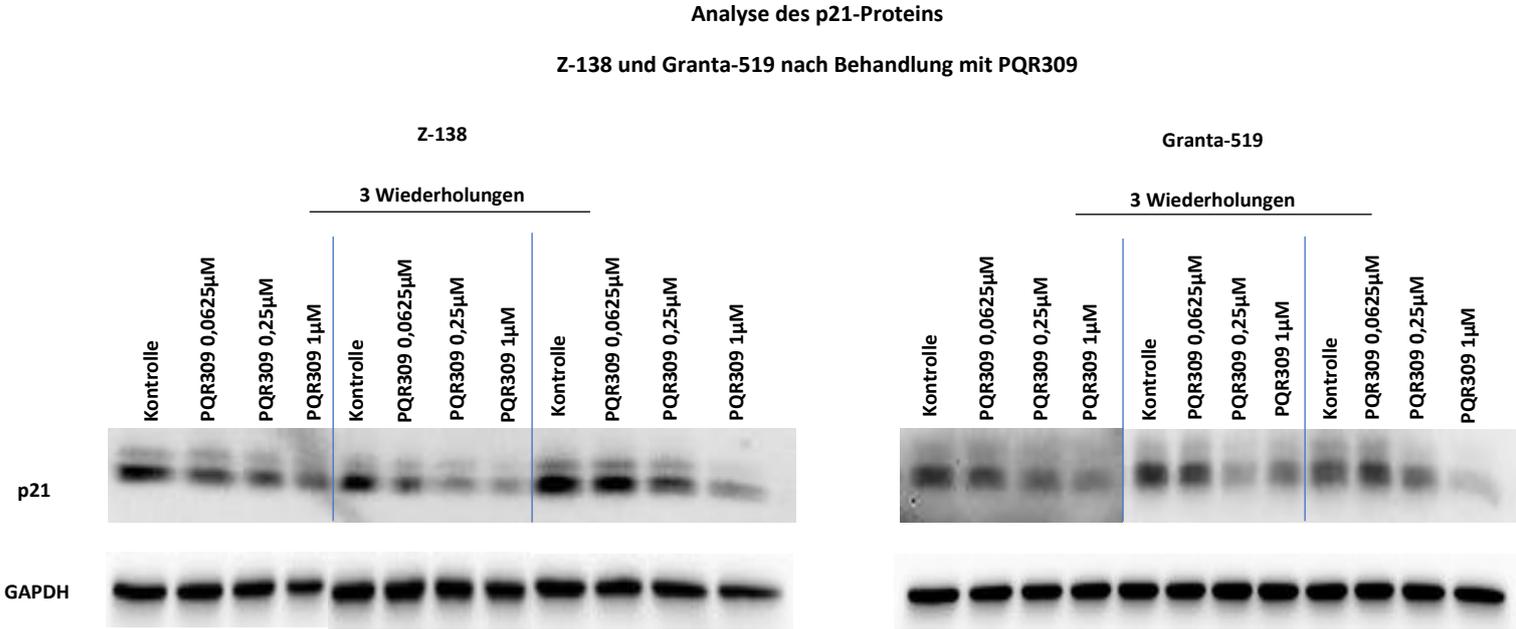


Abbildung 27: p21-Protein-Level in Z-138 und Granta-519 nach Behandlung mit unterschiedlichen PQR309-Konzentrationen

6 Diskussion

6.1 Viabilitäts- und Proliferationsassay

6.1.1 PQR309

PQR309 ist ein pan-PI3K und doppelter mTOR-Inhibitor und hemmt somit einen wichtigen konstitutiv aktivierten Signalweg in den B-Zelllymphomen, ebenso im Mantelzelllymphom. Es konnte bereits in verschiedenen Lymphomen eine vivo-Aktivität nachgewiesen werden (Tarantelli, Gaudio, et al., 2018). In dieser Arbeit wurde analysiert, inwieweit PQR309 das Wachstum und die Viabilität von MCL-Zelllinien beeinflussen kann. Sowohl anhand von Proliferations- als auch Viabilitätsdaten konnte gezeigt werden, dass MCL-Zelllinien sensitiv gegenüber PQR309 waren. Die meisten getesteten Zellen zeigten gegenüber PQR309 beinahe identisches Verhalten der Sensitivität im Proliferations- und Viabilitätsassay: die Zellen mit hoher Empfindlichkeit oder Resistenz im Proliferationsassay erschienen ebenfalls empfindlich oder resistent im Viabilitätsassay.

Interessanterweise präsentierte sich Maver-1 sensitiv im Proliferationsassay, lieferte hingegen eine geringe Reduktion der vitalen Zellen. Eine Möglichkeit diesen Unterschied in der Empfindlichkeit von Maver-1 gegenüber PQR309 genauer zu verstehen, wäre ein Vergleich der Wirkung von jeweiligen Monotherapien mit selektiven PI3K, mTORC1 und mTORC2 Inhibitoren mit der einer Kombinationstherapie aus diesen Inhibitoren. So zählt mTORC1 zu den Hauptregulatoren der Proteinsynthese und der Proliferation (Pópulo et al., 2012; Smith, 2012). mTORC2- und der PI3K/AKT-Signalweg sind überwiegend in die Regulation der Apoptose und das Überleben der Zellen eingebunden (Murray et al., 2017; Pópulo et al., 2012; Saxton et al., 2017a; Werfel et al., 2018). Andererseits kann eine Blockade von mTORC1 ein Ausbleiben der negativen Feedbackschleife von S6K zu dem stromaufwärts von PI3K liegenden IRS1-Protein auslösen. Dies kann zu einer Verstärkung der PI3K-Signalkaskade führen und sichert damit ein besseres Überleben der Zelle (Laplante et al., 2009; Werfel et al., 2018).

Möglicherweise sind die Maver-1-Zellen empfindlicher gegenüber mTORC1-Inhibition. So sollte der Einsatz eines selektiven mTORC1-Inhibitors die proliferative Aktivität der

Maver-1 stärker als eines selektiven PI3K- oder mTORC2-Inhibitors beeinflussen (Bheemanaboina, 2020; Werfel et al., 2018).

Die Erstellung eines Proteinexpressionsmusters von MCL-Zellen nach einer Behandlung dieser mit dem PQR309-Inhibitor könnte zudem weitere Einblicke in die Ursache für die unterschiedliche Wirkung des Inhibitors auf Proliferation und Viabilität liefern. Dabei könnte es gelingen, Inhibitor-spezifische Abweichungen in der Proteinexpression aufzudecken. Es wäre denkbar, dass dadurch neue potenzielle Ansätze für die Therapie des Mantelzelllymphoms und anderer maligner Erkrankungen gefunden werden können.

6.1.2 Pan-PI3K-Inhibitor, mTORC1-Inhibitor und mTORC1/C2-Inhibitor sowie Kombinationsexperimente

Um besser verstehen zu können, welche Effekte bei den verschiedenen MCL-Zelllinien Einzelsubstanzen des pan-PI3K und dualen mTOR-Inhibitors PQR309 bewirken, wurden die Zellen entsprechend mit Inhibitoren dieser einzelnen Signalmoleküle behandelt. Insgesamt wurde deutlich, dass die alleinige Inhibition von PI3K oder mTORC1 die Wirkung des PQR309 nicht erklären konnte. Die Kombination von pan-PI3K- und mTORC1-Inhibition ergab sogar in manchen Zelllinien eine höhere Proliferation als in unbehandelten Kontrollen. Das Ergebnis deutete darauf hin, dass gleichzeitige Inhibition von mTORC1 und mTORC2 wesentlich zu PQR309 antiproliferativem Effekt beiträgt. Diese Annahme wurde durch die starke antiproliferative Wirkung des doppelten mTOR-Inhibitors KU0063794 belegt, der in einigen MCL-Zellen allein zu einer maximalen Reduktion der Viabilität und der Proliferation führte.

Andererseits konnte in der Literatur gezeigt werden, dass selektive Ausschaltung des mTORC1-Signalweges einen Überlebensvorteil der malignen Zelle bieten kann. Dieses Phänomen lässt sich vermutlich mit dem Wegfall der negativen Feedbackschleife von mTORC1 nach dessen Hemmung an die PI3K-Signalkaskade erklären. Ein aktiver PI3K-Signalweg würde nun die Viabilität der Zelle steigern (Werfel et al., 2018). Diese Annahme könnte die Zunahme der viablen Zellen der Granta-519 nach Behandlung mit Temsirolimus nach 24 und 48 Stunden durchaus erklären. Eine Ausnahme zeigten die Granta-519-Zellen nach 72 Stunden: die Monotherapie mit pan-

PI3K-Inhibitor CAL101 brachte denselben Effekt und erhöhte ebenfalls die Viabilität der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch ein kombinierter Einsatz dieser beider Therapeutika steigerte den Anteil der viablen Zellen der Granta-519, anstatt eine erwünschte Abnahme der Zellviabilität gegenüber der unbehandelten Kontrollzellen auszulösen.

Der doppelte mTOR-Inhibitor KU0063794 hingegen führte zu einer wesentlichen Reduktion der Zellviabilität sowie der Proliferation und erwies sich damit als einer der effektivsten Inhibitoren. Zudem lieferte die Kombination mit dem pan-PI3K-Inhibitor CAL101 einen gering größeren Effekt auf die Zellen als pan-PI3K- und doppelter mTOR-Inhibitor PQR309. Dieses Ergebnis hebt deutlich hervor, welche wichtige Rolle dem mTORC2-Signalweg im Überleben und Proliferation einer Zelle zugewiesen werden kann. Der ausgeprägte synergistische Effekt durch die kombinierte Therapie aus CAL101 und KU0063794 konnte vermutlich durch Blockierung des AKT-Moleküls erzielt werden. Der AKT-Signalweg stellt nämlich einen gemeinsamen Angriffspunkt durch Überlappungen der mTORC2- und PI3K-Signalkaskaden stromabwärts dar. Eine mögliche Erklärung für die etwas bessere Wirkung der Kombinationstherapie aus CAL101 und KU0063794 im Vergleich zu PQR309 könnte einerseits eine unterschiedliche Affinität der hier verwendeten Substanzen untereinander, andererseits die Auswahl der verwendeten Konzentrationen sein. Wie erwartet, war eine Behandlung mit der Kombination aus CAL101 und KU0063794 nicht effizienter als die mit PQR309 bei allen MCL-Zelllinien.

Bei Jeko-1 zeigte sich beispielsweise deutlich, dass deren Sensitivität gegenüber PQR309 auf die kombinierte Hemmung von pan-PI3K und beider mTOR-Komplexe zurückzuführen ist, da die pan-PI3K und mTORC1-Inhibition keine synergistischen Effekte gegenüber der selektiven PI3K-Inhibition aufwies. Eine Kombination aus drei Substanzen panPI3K, mTORC1 und mTORC2 lieferte nämlich in diesem Fall eine stärkere Abnahme des Zellwachstums und der Zellviabilität im Vergleich zum Einsatz einzelner Inhibitoren pan-PI3K sowie mTORC1 und -C2. Bemerkenswert war, dass bereits eine doppelte Inhibition von mTORC1 und mTORC2 mit KU0063794 eine stärkere antiproliferative Wirkung auf die getesteten MCL-Zellen unter den einzelnen Therapeutika zeigte.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse ergab sich, dass für einige der MCL-Zellen eine doppelte Inhibition von mTORC1 und -C2 genügt, um einen maximalen Effekt in der

Abnahme der Zellviabilität und des Zellwachstums zu erzielen. Dabei bedürfen andere Zelllinien darüber hinaus eine zusätzliche Inhibition des PI3K-Signaweges. Selektive Blockierung von pan-PI3K und von mTORC1 oder eine Kombination aus panPI3K und mTORC1-Inhibitoren zeigte bei jeder getesteten Zelle eine zu schwache Reduktion des Wachstums und der Zellvitalität, im Gegensatz zu einer kombinierten Behandlung aus Substanzen der pan-PI3K/mTORC1 und -C2-Signalwege. Aufgrund der Tatsache, dass in dieser Arbeit kein rein selektiver mTORC2-Inhibitor verwendet wurde, kann nicht abschließend geklärt werden, ob der antiproliferative Effekt von PQR309 nebst Inhibition von pan-PI3K auf die Inhibition von beiden mTOR-Komplexe oder alleinige Inhibition von mTORC2 zurückzuführen ist. Werfel et al. konnte beispielsweise in seiner Studie demonstrieren, dass der Einsatz eines selektiven mTORC2-Inhibitors zu einer merklichen Reduktion der Proliferationsrate und Viabilität der Tumorzellen des Brustdrüsenkarzinoms geführt hat (Werfel et al., 2018).

6.1.3 PQR309 und verschiedene Kombinationspartner

Um die Frage zu beantworten, ob die antiproliferative Wirkung von PQR309 noch optimal verstärkt oder gesteigert werden könnte, wurden verschiedene Inhibitoren anderer zellulärer Signalwege mit PQR309 kombiniert.

Niclosamid, ein STAT3-Signalweg-Inhibitor, welcher zwar auf die MCL-Zellpopulation eine antiproliferative Wirkung zeigte, konnte nach einer kombinierten Therapie mit PQR309 keine weitere Wirkungssteigerung erzielen. Bei der Zelllinie Jeko-1 lieferte die Kombinationstherapie sogar antagonistische Effekte. Diese Ergebnisse stimmen jedoch mit den Untersuchungen in Zellen des ovariellen Karzinoms nicht überein. Eine bestehende Resistenz gegenüber PI3K- und mTORC1/C2-Inhibitoren konnte mittels einer Dephosphorylierung von STAT3-Molekül aufgehoben werden und führte zu erneuter Steigerung der Sensitivität gegenüber einer Inhibition des PI3K- und mTORC1/2-Signalweges (Guo et al., 2016). Laut einer Studie zur Untersuchung von Zellen der Kolonkarzinome, welche sich mit einem Inhibitor der STAT3-Phosphorylierung Convallatoxin beschäftigte, konnte eine Interaktion zwischen den mTORC1/C2 und STAT3-Signalwegen demonstriert werden. Die Behandlung der malignen Enterozyten mit Convallatoxin lieferte nebst einer Abnahme der STAT3 Aktivität innerhalb der JAK1/JAK2-Signalkaskade auch eine Reduktion des phosphorylierten STAT3-Anteils stromabwärts der PI3K- und mTOR-Signalwege. Die

Abnahme der Zellviabilität konnte nicht nur in vitro nachgewiesen werden, sondern auch in einem Mausxenotransplantationmodell gezeigt werden (Zhang et al., 2020). Diese neuen Erkenntnisse liefern zwar keine direkte Erklärung für das antagonistische Verhalten der Jeko-1-Zelllinie nach kombinierter Therapie von PQR309 und Niclosamid, lassen aber eine Existenz einiger Rückkopplungssignale zwischen den beiden Signalwegen vermuten. Die Existenz dieser könnte den antagonistischen Effekt von Jeko-1 durchaus erklären.

Trotz erheblicher Überlappungen in den Signalwegen von mTOR und Jak1/2 (Bai et al., 2020), brachte eine Kombination aus PQR309 und dem Jak1/2-Inhibitor Ruxolitinib lediglich einen additiven Effekt auf die getesteten Lymphomzellen. Möglicherweise ist die Wirkung beider Substanzen auf die MCL-Zellen unabhängig voneinander.

Einen synergistischen Effekt zeigte der Bruton-Tyrosinkinase-Inhibitor Ibrutinib in der Zelllinie Jeko-1, dieser fehlte jedoch bei Granta-519 und Z-138. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Resistenz der Zellen auf den komplementären Wegen basiert, welche die Wirkung der Bruton-Tyrosinkinase aufheben können. Erstellung einer Protein-Expressionsanalyse könnte in der Zukunft helfen die Unterschiede zwischen sensitiven und resistenten Zelllinien aufzudecken und so neue Therapieeinsätze zu entwickeln. In diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen wurde in der Vergangenheit in den Ibrutinib-sensitiven Zelllinien ein Multiproteinkomplex, My-T-BCR genannt, entdeckt (Phelan et al., 2018). Dieser Komplex enthält neben den beiden mTOR-Komponenten zusätzlich das MYD88-Molekül und ist an der B-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion mitbeteiligt. Denkbar wäre, dass ein solcher Komplex ebenfalls in den sensitiven MCL-Zellen existiert und die synergistischen Effekte zwischen Ibrutinib und PQR309 in diesen Zellen erklären könnte.

Unterschiedliche Ergebnisse, je nach verwendeter Zelllinie, zeigte auch der Inhibitor des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 ABT199. Eine Dysregulation des Bcl-2-Signalweges stellt bei vielen B-Zell-Lymphomen eine Überlebensstrategie dar (Davids, 2017). Vermutlich reagieren diejenigen MCL-Zelllinien besonders empfindlich gegenüber Inhibition des Bcl-2-Proteins, die diese Strategie auch verfolgen, während resistente Zellen möglicherweise keine Fehlregulation des Bcl-2-Signalweges aufzeigen. Bcl-2 befindet sich stromabwärts des AKT-Signalweges und wird sowohl von Signalen aus dem PI3K- als auch dem mTOR2-Signalweg beeinflusst. Es ist ein komplexes Signalnetzwerk, bestehend aus mehreren zusätzlichen miteinander

verflochtenen Signalen (Laplane et al., 2009). Einerseits kann eine Inhibition eines einzelnen Moleküls innerhalb dieser komplexen Systeme den Zelltod auslösen, andererseits existieren möglicherweise komplementäre Netzwerke, welche zu einer Resistenz gegenüber der Inhibition dieses Moleküls in den Tumorzellen führen.

Der Mek-Inhibitor PD0325901 dient bei vielen verschiedenen Neoplasien als erfolgreicher Therapieansatz (Diamond et al., 2016; Eleveld et al., 2015; Foster et al., 2020; Nguyen et al., 2010). Dies konnte für die hier untersuchten MCL-Zelllinien allerdings nicht bestätigt werden. Die mit dem MEK-Inhibitor behandelten Zelllinien Jeko-1 und Z-138 erwiesen sich als resistent. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Untersuchungen mehrerer Studien für die zahlreichen Tumorentitäten, wie beispielsweise des Lungenkarzinoms oder des Glioblastoms. Hier konnte nämlich eine deutliche Synergie nach Einsatz der Inhibitoren dieser beiden Signalwege nachgewiesen werden (Kuger et al., 2015). Diese Resultate sind nicht überraschend aufgrund der zahlreichen Überlappungen beider Signalkaskaden, welche jedoch weiterhin nicht vollständig verstanden und erforscht sind. Es wäre denkbar, dass in den beiden MCL-Zelllinien Jeko-1 und Z-138 noch unentdeckte Mutationen bzw. Interaktionswege innerhalb beider Signalwege existieren. Interessanterweise lieferte Granta-519, eine der allgemein resistenten MCL-Zellen, mit steigenden Konzentrationen der Kombinationstherapie steigende additive Wirkung und entsprach nahezu den Studienergebnissen der oben erwähnten Arbeitsgruppen.

Auch eine Behandlung mit Proteasom-Inhibitor Bortezomib, welche bei der Zelllinie Jeko-1 monotherapeutisch sogar die Zellproliferation anregte, zeigte keine vielversprechenden Ergebnisse. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu vorbeschriebener Therapiewirksamkeit des Proteasom-Inhibitors bei Zellen des Mantelzelllymphoms und anderen lymphoiden Neoplasien, welche wahrscheinlich über die Mechanismen der Akkumulation von falsch gefalteten, gealterten und mutierten Proteinen sowie Inhibition der Autophagie angenommen wurde (Contreras et al., 2018; Fricker, 2020; Manasanch et al., 2017; Tan et al., 2019; Yuan et al., 2019).

Eine Kombination von BET-Inhibitor JQ-1 mit PQR309 lieferte in einigen MCL-Zellen einen synergistischen Effekt. Möglicherweise ist das BET-Molekül für das Überleben von einigen MCL-Zellen verantwortlich. Universell für alle MCL-Zellen scheint jedoch diese Überlebensstrategie nicht zu sein. So lieferte die Zelllinie Granta-519 gegenüber JQ-1 eine eindeutige ausgeprägte Resistenz. Ein ähnliches Verhalten

wurde bereits in der Literatur beschrieben: nicht alle MCL-Zellen zeigten eine Sensitivität gegenüber BET-Inhibition (Sun et al., 2018; Sun et al., 2015; Tarantelli, Bernasconi, et al., 2018). Eine Erklärung dafür wäre, dass das BET-Protein nur in einem Teil der MCL-Zellen exprimiert wird (Dorfman et al., 2004).

6.1.4 PQR309 und PIM1-Kinase-Inhibitor

Den stärksten Synergismus lieferte die Kombination von PQR309 mit dem PIM1-Kinase-Inhibitor AZD1208 bei allen untersuchten Zelllinien, jedoch stellten sich auch hier einige Unterschiede bei den verschiedenen Zelllinien dar. Eine gesteigerte PIM-1-Expression ließ sich in 42% aller untersuchten Fälle in den MCL-Zelllinien nachweisen, wie eine Untersuchung aus dem Jahr 2008 zeigte (Hogan et al., 2008). Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass solche MCL-Zellen vermutlich besonders empfindlich gegenüber PIM-1 Inhibition reagieren. Es könnte sich für ein therapeutisches Konzept vorteilhaft erweisen, zunächst die PIM-1-Expressionsrate zu bestimmen und so die empfindlichen Tumore zu identifizieren. Interessanterweise konnte in Granta-519 ein Proliferationsanstieg nach Monotherapie mit AZD1208 detektiert werden. In der Studie von Hogan et al. (2008) wurde angenommen, dass bei MCL-Zellen, die PIM-1-Protein nicht überexprimieren, aktiviertes PIM-1 im Folgeschritt das p53-Protein aktiviert. Eine Zellzyklusblockade mit reduzierter Proliferation ist die Folge. PIM-1-Inhibition dagegen würde diesen Zellzyklusarrest beenden und die Proliferation antreiben.

Theoretisch ähnliche Ergebnisse wie bei der Kombination aus PQR309 mit AZD1208 sollte die Kombination von pan-PI3K Inhibitor CAL101 und doppeltem mTOR Inhibitor KU0063794 mit PIM-1-Inhibitor AZD1208 liefern. Diese Überlegungen wurden in den durchgeführten Experimenten bestätigt.

6.2 Zellzyklus- und Apoptoseanalyse von PQR309

6.2.1 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse stellte einen Versuch dar, die dosisabhängige Reduktion der Proliferation von MCL-Zellen nach Behandlung mit steigenden PQR309-Konzentrationen zu erklären. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass PQR309 den

Anteil der Zellen in S- oder G2-Phase verringert und die Zellen in der G1-Phase arretiert mit Anstieg des Zellanteils in dieser Phase. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde der DNA-Gehalt der Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Entsprechend der Zellempfindlichkeit in den Proliferationsexperimenten stieg der Anteil der Zellen in der G1-Phase. Gleichzeitig nahm der Zellanteil in der S-Phase mit steigender PQR309-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen ab. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase ließ sich kaum beeinflussen. Dies deutet darauf hin, dass mit PQR309 behandelte Zellen den Übergang von der G1- in die S-Phase nicht bewältigen können. Die Regulierung des Übergangs wird in gesunden Zellen durch die CDK4 und CDK6 gewährleistet und kann durch die Tumorsuppressorgene Rb, p107 und p130 inhibiert werden. Konstitutive Aktivierung des Überganges von der G1- in die S-Phase gehört bei zahlreichen Tumorarten zur Überlebensstrategie (Bertoli et al., 2013).

Unerwartet zeigte die Zelllinie Z-138 keine nennenswerten Zellzykluseffekte. Die Verteilung der drei Zellzyklusphasen der Zelllinie verhielt sich beinahe identisch zu den Zellen der Kontrollreihe. Möglicherweise könnte die Seneszenz der Grund dafür sein.

6.2.2 Apoptose

Induktion der Apoptose gilt allgemein als ein weiterer möglicher Mechanismus der Viabilitäts- und Proliferationsreduktion der untersuchten Zellen. Aus diesem Grund wurde der Anteil der apoptotischen Zellen nach Behandlung mit pan-PI3K, mTORC1 und C2 in Monotherapie sowie nach der Kombination dieser Substanzen gemessen. Bei keiner der Behandlungsreihen konnte ein wesentlicher apoptotischer Effekt verzeichnet werden. Es konnte weder die alleinige Behandlung mit PQR309 noch die zusätzliche Kombination mit synergistisch wirkendem AZD1208 eine Apoptose induzieren. Diese Ergebnisse bestätigen weiter die Annahme, dass der anti-proliferative Effekt der Zellen auf Zellzyklusarrest in der G1-Phase zurückzuführen ist. Es konnte auch keine Nekrose der Zellen in den Experimenten nachgewiesen werden.

6.3 Proteinexpression unter Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren

Die Behandlung der MCL-Zellen mit PQR309 zeigte eine dephosphorylierende Wirkung auf verschiedene Signalproteine. Der stärkste dephosphorylierende Effekt konnte unter den untersuchten Proteinen bei AKT, MEK und Rictor verzeichnet werden. Aufgrund der Tatsache, dass AKT eines der Hauptsignalmoleküle des PI3K-Signalweges darstellt, war die Reduktion der AKT-Phosphorylierung zu erwarten (Osaki et al., 2004; Xie et al., 2019). Auch wurden die beiden mTOR-Komplexe von PQR309 inhibiert: es zeigte sich eine Dephosphorylierung des in mTORC1-Multiprotein-Komplex eingebunden Raptor-Proteins sowie des in mTORC2-Multiprotein-Komplex eingebunden Rictor-Proteins.

Der pan-PI3K Inhibitor CAL101 führte, wie erwartet, zu einer Abnahme von AKT-Phosphorylierung, ebenso wie in geringerem Maße von MEK, ein Protein innerhalb des MEK/MAPK/ERK-Signalweges. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass CAL101 keine rein selektive Wirkung besitzt und zusätzlich den MEK/MAPK/ERK-Signalweg beeinflusst. Kürzlich wurde zudem in der Studie von Cao et al. eine Interaktion zwischen den AKT- und MEK/MAPK/ERK-Signalwegen beschrieben, welche die Dephosphorylierung von MEK erklären könnte. Der Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3)-dependent Rac exchange factor 1 (PREX1) kann nach der Bindung von aktiviertem PIP3 beide Signalwege PI3K/AKT/mTOR und MEK/MAPK/ERK aktivieren (Cao et al., 2019). Fehlende Bindung zwischen PREX1 und PIP3 durch die Inhibition von PI3K-Molekül mit CAL101 könnte die Erklärung für die Dephosphorylierung von MEK liefern.

Vermutlich ist jedoch die Dephosphorylierung des MEK-Proteins überwiegend durch Inhibition von mTORC1 und C2 bedingt. Eine Überlappung zwischen diesen zwei Signalwegen wurde in mehreren Untersuchungen beschrieben (Chappell et al., 2011; Ersahin et al., 2015; Morley, 1997). Die dephosphorylierende Wirkung auf das MEK-Molekül fiel unter PQR309 stärker als unter CAL101 aus. Zudem unterstreicht eine beinahe gleich starke Abnahme der MEK-Phosphorylierung nach der Behandlung der MCL-Zellen mit dem mTORC1 und C2 Inhibitor KU0063794 im Vergleich zu PQR309 die wichtige Rolle dieser beider Komplexe.

Der durch PQR309 induzierte Zellzyklusarrest könnte möglicherweise durch Abnahme der Phosphorylierung von Rb-Protein erklärt werden. Der phosphorylierte Rb-Anteil konnte nach Gabe von 1 μM PQR309 gering reduziert werden. Das spiegelte sich auch in der Zellzyklusanalyse mit geringem Rückgang der Zellzahl in der S-Phase und entsprechender Zunahme in der G1-Phase wider. Dieser Effekt fiel am stärksten bei Jeko-1 und Z-138 ebenfalls nach Gabe von 1 μM PQR309 aus. Somit konnte die Proteinanalyse diese Hypothese grundsätzlich bestätigen. Theoretisch könnte PQR309 auch an einer anderen Stelle in den Zellzyklus eingreifen. Mögliche Kandidaten dafür könnten p107 und p130 sein (Bertoli et al., 2013). Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht. Interessanterweise konnte, obwohl bei Z-138 eine erkennbare Dephosphorylierung des Rb-Proteins bereits nach 0.25 μM PQR309 zu sehen war, kein wesentlicher Zellzyklusarrest nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit untersuchte Kombination von PQR309 mit dem PIM-1 Inhibitor AZD1208 zeigte in den Experimenten einen starken Synergismus. Nach der Behandlung der Granta-519-Zelllinie mit beiden Substanzen konnte eine dephosphorylierende Wirkung auf den Translationsfaktor 4EBP1 beobachtet werden, die bei den jeweiligen Monotherapien fehlte. Wahrscheinlich trat dieser Effekt aufgrund der Suppression von 4EBP1 durch die Überlappung des STAT5/PIM-1 und des mTORC1-Signalweges auf. Beide Signalkaskaden können nämlich 4EBP1 aktivieren. Somit gehört das Protein 4EBP1 zu einem wichtigen gemeinsamen Angriffspunkt beider Medikamente PQR309 und AZD1208 (Nogami et al., 2019; Okada et al., 2018).

6.4 Seneszenzuntersuchung der Zelllinie Z-138

Aufgrund einer eindeutigen Reduktion der Zellviabilität und der proliferativen Aktivität der Zelllinie Z-138 nach Einsatz von PQR309 bei gleichzeitig durchflusszytometrisch kaum detektierbarem Zellzyklusarrest sowie Anteil der Zellen in der Apoptose, stellte sich die Frage, ob der antiproliferative Effekt von PQR309 möglicherweise auf das Auslösen einer Seneszenz zurückzuführen wäre. Eine p21-assoziierte Seneszenz könnte für den antiproliferativen Effekt verantwortlich sein. Das p21-Protein ist ein Teil der p53-Signalkaskade und mit zellulärer Seneszenz assoziiert. Eine Phosphorylierung aktiviert das Protein (Jiang et al., 2017; Noren Hooten et al., 2017; Regulski, 2017; Riessland et al., 2019). Jedoch zeigte sich eine Abnahme des

phosphorylierten p21-Anteils mit steigenden PQR309-Konzentrationen. Das spricht gegen die Hypothese, dass der antiproliferative Effekt von PQR309 über die p21-assoziierte Seneszenz ausgelöst wäre. Ein weiterer Kandidat dafür könnte p16 sein, der in der hier vorgestellten Arbeit nicht untersucht wurde.

7 Zusammenfassung

Das Mantelzelllymphom gehört zu den B-Zell-Neoplasien aus der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome. Fast alle MCL-Zellen zeigen eine Überexpression des Zyklins D1 mit einem konstitutiv aktivierten Zellzyklus. Trotz zahlreicher Fortschritte in der Behandlung und teils besseren molekularbiologischen Verständnis der Erkrankung ist das MCL nach wie vor schwer zu behandeln und hat langfristig eine sehr schlechte Prognose. Monotherapien mit Inhibierung einzelner Signalwege sind oftmals wenig wirksam, da meistens kompensatorische Signalwege innerhalb der Zelle existieren, welche zu einer raschen Resistenz führen können. Aus diesem Grund sind neue Therapieansätze dringend notwendig.

In der hier vorgestellten Arbeit wurde die Wirkung von PQR309 auf verschiedene MCL-Zelllinien in vitro untersucht. PQR309 ist ein pan-PI3K-, dualer mTOR-Inhibitor und inhibiert dementsprechend gleich mehrere wichtige Signalwege, die für das Überleben und die Proliferation einer Zelle verantwortlich sind. Die untersuchten MCL-Zelllinien zeigten alle eine dosisabhängige Reduktion der Proliferation und Viabilität auf die Behandlung mit PQR309, jedoch bestanden Unterschiede in der Sensitivität der Zelllinien. Um herauszufinden, welche Signalwege für diese Effekte von PQR309 verantwortlich waren, wurden selektive Inhibitoren der PI3K-, mTORC1- sowie mTORC2-Signalwege eingesetzt und in Kombination verwendet. Dabei stellte sich heraus, dass eine duale Inhibierung von mTORC1 und mTORC2 besonders wichtig ist und die Kombination mit PI3K-Inhibition synergistisch wirkt. Eine reine Inhibition von mTORC1 und pan-PI3K sowie eine Kombination der beiden Inhibitoren waren nur moderat effektiv.

Die Kombination von PQR309 mit Inhibitoren anderer zellulärer Signalwege lieferte zum Teil vielversprechenden Synergismus. Die besten Ergebnisse brachte dabei die Kombination von PQR309 und PIM-1-Kinase-Inhibitor AZD1208. Eine additive Wirkung wurde mit dem Jak1/2-Inhibitor Ruxolitinib erzielt. Der gleichzeitige Einsatz von PQR309 und Inhibition der Bruton-Kinase oder des BET-Proteins zeigte in manchen Zelllinien synergistische Effekte, in anderen war die Kombination dagegen wirkungslos. Der gleiche Effekt fand sich auch für die Inhibition von Bcl-2. Eine Kombination von PQR309 mit dem Inhibitor des STAT3- und MEK-Signalweges lieferte zum Teil positive Resultate. Eine kombinierte Therapie aus PQR309 und Bortezomib wies keine wesentliche Wirksamkeit in den getesteten MCL-Zellen auf.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass MCL-Zellen eine breite genetische Heterogenität aufweisen. In der Zukunft wäre daher eine vorangehende Resistenzanalyse vor der Therapieplanung mit solchen und ähnlichen Signalweginhibitoren sinnvoll. Auf diesem Weg könnte vermieden werden, dass die Patienten mit für ihren Tumor unwirksamen Substanzen behandelt werden. Diese personalisierte Strategie könnte langfristig die Überlebensraten der betroffenen Personen steigern.

8 Literaturverzeichnis

- Alzahrani, A. S. (2019). PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside. *Semin Cancer Biol*, 59, 125-132. doi:10.1016/j.semcancer.2019.07.009
- Amin, H. M., McDonnell, T. J., Medeiros, L. J., Rassidakis, G. Z., Leventaki, V., O'Connor, S. L., . . . Lai, R. (2003). Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines. *Arch Pathol Lab Med*, 127(4), 424-431. doi:10.5858/2003-127-0424-comclc
- Aziz, A. U. R., Farid, S., Qin, K., Wang, H., & Liu, B. (2018). PIM Kinases and Their Relevance to the PI3K/AKT/mTOR Pathway in the Regulation of Ovarian Cancer. *Biomolecules*, 8(1), 7. doi:10.3390/biom8010007
- Bachmann, M., & Möröy, T. (2005). The serine/threonine kinase Pim-1. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(4), 726-730. doi:10.1016/j.biocel.2004.11.005
- Bai, Y., Wang, W., Yin, P., Gao, J., Na, L., Sun, Y., . . . Zhao, C. (2020). Ruxolitinib Alleviates Renal Interstitial Fibrosis in UUO Mice. *Int J Biol Sci*, 16(2), 194-203. doi:10.7150/ijbs.39024
- Beaufils, F., Cmiljanovic, N., Cmiljanovic, V., Bohnacker, T., Melone, A., Marone, R., . . . Wymann, M. P. (2017). 5-(4,6-Dimorpholino-1,3,5-triazin-2-yl)-4-(trifluoromethyl)pyridin-2-amine (PQR309), a Potent, Brain-Penetrant, Orally Bioavailable, Pan-Class I PI3K/mTOR Inhibitor as Clinical Candidate in Oncology. *J Med Chem*, 60(17), 7524-7538. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00930
- Bertoli, C., Skotheim, J. M., & de Bruin, R. A. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(8), 518-528. doi:10.1038/nrm3629
- Bheemanaboina, R. R. Y. (2020). Isoform-Selective PI3K Inhibitors for Various Diseases. *Curr Top Med Chem*, 20(12), 1074-1092. doi:10.2174/1568026620666200106141717
- Brunen, D., García-Barchino, M. J., Malani, D., Jagalur Basheer, N., Lieftink, C., Beijersbergen, R. L., . . . Bernards, R. (2016). Intrinsic resistance to PIM kinase inhibition in AML through p38 α -mediated feedback activation of mTOR signaling. *Oncotarget*, 7(25), 37407-37419. doi:10.18632/oncotarget.9822
- Camps, J., Salaverria, I., Garcia, M. J., Prat, E., Beà, S., Pole, J. C., . . . Campo, E. (2006). Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines. *Leuk Res*, 30(8), 923-934. doi:10.1016/j.leukres.2005.11.013
- Cao, Z., Liao, Q., Su, M., Huang, K., Jin, J., & Cao, D. (2019). AKT and ERK dual inhibitors: The way forward? *Cancer Lett*, 459, 30-40. doi:10.1016/j.canlet.2019.05.025
- Chappell, W. H., Steelman, L. S., Long, J. M., Kempf, R. C., Abrams, S. L., Franklin, R. A., . . . McCubrey, J. A. (2011). Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget*, 2(3), 135-164. doi:10.18632/oncotarget.240
- Cheah, C. Y., Seymour, J. F., & Wang, M. L. (2016). Mantle Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*, 34(11), 1256-1269. doi:10.1200/jco.2015.63.5904
- Chen, K., Yang, J., Li, J., Wang, X., Chen, Y., Huang, S., & Chen, J. L. (2016). eIF4B is a convergent target and critical effector of oncogenic Pim and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in Abl transformants. *Oncotarget*, 7(9), 10073-10089. doi:10.18632/oncotarget.7164

- Chen, L., & Guo, D. (2017). The functions of tumor suppressor PTEN in innate and adaptive immunity. *Cell Mol Immunol*, *14*(7), 581-589. doi:10.1038/cmi.2017.30
- Collins, G. P., Eyre, T. A., Schmitz-Rohmer, D., Townsend, W., Popat, R., Giulino-Roth, L., . . . Dreyling, M. (2021). A Phase II Study to Assess the Safety and Efficacy of the Dual mTORC1/2 and PI3K Inhibitor Bimralisib (PQR309) in Relapsed, Refractory Lymphoma. *Hemasphere*, *5*(11), e656. doi:10.1097/hs9.0000000000000656
- Contreras, L., Calderon, R. I., Varela-Ramirez, A., Zhang, H. Y., Quan, Y., Das, U., . . . Aguilera, R. J. (2018). Induction of apoptosis via proteasome inhibition in leukemia/lymphoma cells by two potent piperidones. *Cell Oncol (Dordr)*, *41*(6), 623-636. doi:10.1007/s13402-018-0397-1
- Cortelazzo, S., Ponzoni, M., Ferreri, A. J., & Dreyling, M. (2012). Mantle cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, *82*(1), 78-101. doi:10.1016/j.critrevonc.2011.05.001
- Cybulski, N., & Hall, M. N. (2009). TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends Biochem Sci*, *34*(12), 620-627. doi:10.1016/j.tibs.2009.09.004
- Daids, M. S. (2017). Targeting BCL-2 in B-cell lymphomas. *Blood*, *130*(9), 1081-1088. doi:10.1182/blood-2017-04-737338
- Diamond, E. L., Durham, B. H., Haroche, J., Yao, Z., Ma, J., Parikh, S. A., . . . Abdel-Wahab, O. (2016). Diverse and Targetable Kinase Alterations Drive Histiocytic Neoplasms. *Cancer Discov*, *6*(2), 154-165. doi:10.1158/2159-8290.Cd-15-0913
- Dorfman, D. M., Hwang, E. S., Shahsafaei, A., & Glimcher, L. H. (2004). T-bet, a T-cell-associated transcription factor, is expressed in a subset of B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol*, *122*(2), 292-297. doi:10.1309/aqq2-dvm7-5dvy-0pwp
- 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. doi:10.1016/s0145-2126(02)00026-7
- Dreyling, M., Buske, C., Cairoli, A., Heß, G., Mey, U. J. M., Pott, C., & Raderer, M. (2021). Mantelzell-Lymphom. Retrieved from <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mantelzell-lymphom/@ @guideline/html/index.html>
- Dreyling, M., Buske, C., Drach, J., & Herold, M. (2017). Mantelzell-Lymphom. Retrieved from <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mantelzell-lymphom/@ @view/html/index.html>
- Dreyling, M., Schnaiter, A., Schmidt, C., & Hoster, E. (2016). [Current therapeutic strategies for mantle cell lymphoma]. *Internist (Berl)*, *57*(3), 230-237. doi:10.1007/s00108-016-0017-y
- Eleveld, T. F., Oldridge, D. A., Bernard, V., Koster, J., Colmet Daage, L., Diskin, S. J., . . . Maris, J. M. (2015). Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations. *Nat Genet*, *47*(8), 864-871. doi:10.1038/ng.3333
- Ersahin, T., Tuncbag, N., & Cetin-Atalay, R. (2015). The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol Biosyst*, *11*(7), 1946-1954. doi:10.1039/c5mb00101c
- Foster, J. B., Li, D., March, M. E., Sheppard, S. E., Adams, D. M., Hakonarson, H., & Dori, Y. (2020). Kaposiform lymphangiomatosis effectively treated with MEK inhibition. *EMBO Mol Med*, *12*(10), e12324. doi:10.15252/emmm.202012324
- Fricke, L. D. (2020). Proteasome Inhibitor Drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *60*, 457-476. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010919-023603
- Gasparri, M. L., Bardhi, E., Ruscito, I., Papadia, A., Farooqi, A. A., Marchetti, C., . . . Benedetti Panici, P. (2017). PI3K/AKT/mTOR Pathway in Ovarian Cancer

- Treatment: Are We on the Right Track? *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 77(10), 1095-1103. doi:10.1055/s-0043-118907
- Guo, L., Zhou, B., Liu, Z., Xu, Y., Lu, H., Xia, M., . . . Wang, C. (2016). Blockage of glutaminolysis enhances the sensitivity of ovarian cancer cells to PI3K/mTOR inhibition involvement of STAT3 signaling. *Tumour Biol*, 37(8), 11007-11015. doi:10.1007/s13277-016-4984-3
- Gurska, L. M., Ames, K., & Gritsman, K. (2019). Signaling Pathways in Leukemic Stem Cells. *Adv Exp Med Biol*, 1143, 1-39. doi:10.1007/978-981-13-7342-8_1
- Helman, A., Klochendler, A., Azazmeh, N., Gabai, Y., Horwitz, E., Anzi, S., . . . Ben-Porath, I. (2016). p16(Ink4a)-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nat Med*, 22(4), 412-420. doi:10.1038/nm.4054
- Hogan, C., Hutchison, C., Marcar, L., Milne, D., Saville, M., Goodlad, J., . . . Meek, D. (2008). Elevated levels of oncogenic protein kinase Pim-1 induce the p53 pathway in cultured cells and correlate with increased Mdm2 in mantle cell lymphoma. *J Biol Chem*, 283(26), 18012-18023. doi:10.1074/jbc.M709695200
- Iqbal, A., Eckerdt, F., Bell, J., Nakano, I., Giles, F. J., Cheng, S. Y., . . . Plataniias, L. C. (2016). Targeting of glioblastoma cell lines and glioma stem cells by combined PIM kinase and PI3K-p110 α inhibition. *Oncotarget*, 7(22), 33192-33201. doi:10.18632/oncotarget.8899
- Jebaraj, B. M., Kienle, D., Lechel, A., Mertens, D., Heuberger, M., Ott, G., . . . Stilgenbauer, S. (2013). Telomere length in mantle cell lymphoma. *Blood*, 121(7), 1184-1187. doi:10.1182/blood-2012-08-452649
- Jiang, C., Liu, G., Luckhardt, T., Antony, V., Zhou, Y., Carter, A. B., . . . Liu, R. M. (2017). Serpine 1 induces alveolar type II cell senescence through activating p53-p21-Rb pathway in fibrotic lung disease. *Aging Cell*, 16(5), 1114-1124. doi:10.1111/acer.12643
- Karimian, A., Ahmadi, Y., & Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst)*, 42, 63-71. doi:10.1016/j.dnarep.2016.04.008
- Kodet, R., Mrhalova, M., Krskova, L., Soukup, J., Campr, V., Neskudla, T., . . . Plank, L. (2003). Mantle cell lymphoma: improved diagnostics using a combined approach of immunohistochemistry and identification of t(11;14)(q13;q32) by polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization. *Virchows Arch*, 442(6), 538-547. doi:10.1007/s00428-003-0809-z
- Kuger, S., Flentje, M., & Djuzenova, C. S. (2015). Simultaneous perturbation of the MAPK and the PI3K/mTOR pathways does not lead to increased radiosensitization. *Radiat Oncol*, 10, 214. doi:10.1186/s13014-015-0514-5
- Lamm, N., Rogers, S., & Cesare, A. J. (2019). The mTOR pathway: Implications for DNA replication. *Prog Biophys Mol Biol*, 147, 17-25. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2019.04.002
- Lapante, M., & Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 20), 3589-3594. doi:10.1242/jcs.051011
- Liang, M., Han, X., Vadhan-Raj, S., Nguyen, M., Zhang, Y. H., Fernandez, M., . . . Bueso-Ramos, C. E. (2010). HDM4 is overexpressed in mantle cell lymphoma and its inhibition induces p21 expression and apoptosis. *Mod Pathol*, 23(3), 381-391. doi:10.1038/modpathol.2009.170
- Litchfield, L. M., Boehnke, K., Brahmachary, M., Mur, C., Bi, C., Stephens, J. R., . . . Buchanan, S. G. (2020). Combined inhibition of PIM and CDK4/6 suppresses both mTOR signaling and Rb phosphorylation and potentiates PI3K inhibition in cancer cells. *Oncotarget*, 11(17), 1478-1492. doi:10.18632/oncotarget.27539

- Llanos, S., & García-Pedrero, J. M. (2016). A new mechanism of regulation of p21 by the mTORC1/4E-BP1 pathway predicts clinical outcome of head and neck cancer. *Mol Cell Oncol*, 3(4), e1159275. doi:10.1080/23723556.2016.1159275
- Manasanch, E. E., & Orlowski, R. Z. (2017). Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(7), 417-433. doi:10.1038/nrclinonc.2016.206
- Márk, Á., Hajdu, M., Váradi, Z., Sticz, T. B., Nagy, N., Csomor, J., . . . Sebestyén, A. (2013). Characteristic mTOR activity in Hodgkin-lymphomas offers a potential therapeutic target in high risk disease--a combined tissue microarray, in vitro and in vivo study. *BMC Cancer*, 13, 250. doi:10.1186/1471-2407-13-250
- Merolle, M. I., Ahmed, M., Nomie, K., & Wang, M. L. (2018). The B cell receptor signaling pathway in mantle cell lymphoma. *Oncotarget*, 9(38), 25332-25341. doi:10.18632/oncotarget.25011
- Morley, S. J. (1997). Signalling through either the p38 or ERK mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway is obligatory for phorbol ester and T cell receptor complex (TCR-CD3)-stimulated phosphorylation of initiation factor (eIF) 4E in Jurkat T cells. *FEBS Lett*, 418(3), 327-332. doi:10.1016/s0014-5793(97)01405-1
- Mossmann, D., Park, S., & Hall, M. N. (2018). mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. *Nat Rev Cancer*, 18(12), 744-757. doi:10.1038/s41568-018-0074-8
- Müller, A., Zang, C., Chumduri, C., Dörken, B., Daniel, P. T., & Scholz, C. W. (2013). Concurrent inhibition of PI3K and mTORC1/mTORC2 overcomes resistance to rapamycin induced apoptosis by down-regulation of Mcl-1 in mantle cell lymphoma. *Int J Cancer*, 133(8), 1813-1824. doi:10.1002/ijc.28206
- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(7), 482-496. doi:10.1038/nrm3823
- Murray, E. R., & Cameron, A. J. M. (2017). Towards specific inhibition of mTORC2. *Ageing (Albany NY)*, 9(12), 2461-2462. doi:10.18632/aging.101346
- Nguyen, T. K., Jordan, N., Friedberg, J., Fisher, R. I., Dent, P., & Grant, S. (2010). Inhibition of MEK/ERK1/2 sensitizes lymphoma cells to sorafenib-induced apoptosis. *Leuk Res*, 34(3), 379-386. doi:10.1016/j.leukres.2009.07.013
- Nogami, A., Okada, K., Ishida, S., Akiyama, H., Umezawa, Y., & Miura, O. (2019). Inhibition of the STAT5/Pim Kinase Axis Enhances Cytotoxic Effects of Proteasome Inhibitors on FLT3-ITD-Positive AML Cells by Cooperatively Inhibiting the mTORC1/4EBP1/S6K/Mcl-1 Pathway. *Transl Oncol*, 12(2), 336-349. doi:10.1016/j.tranon.2018.11.001
- Noren Hooten, N., & Evans, M. K. (2017). Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (123), 55533. doi:10.3791/55533
- Okada, K., Nogami, A., Ishida, S., Akiyama, H., Chen, C., Umezawa, Y., & Miura, O. (2018). FLT3-ITD induces expression of Pim kinases through STAT5 to confer resistance to the PI3K/Akt pathway inhibitors on leukemic cells by enhancing the mTORC1/Mcl-1 pathway. *Oncotarget*, 9(10), 8870-8886. doi:10.18632/oncotarget.22926
- Okamoto, M., & Kusumoto, S. (2020). JSH practical guidelines for hematological malignancies, 2018: II. Lymphoma-4. Mantle cell lymphoma (MCL). *Int J Hematol*, 111(1), 5-15. doi:10.1007/s12185-019-02784-x
- Osaki, M., Oshimura, M., & Ito, H. (2004). PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, 9(6), 667-676. doi:10.1023/B:APPT.0000045801.15585.dd

- Pérez-Galán, P., Dreyling, M., & Wiestner, A. (2011). Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*, *117*(1), 26-38. doi:10.1182/blood-2010-04-189977
- Phelan, J. D., Young, R. M., Webster, D. E., Roulland, S., Wright, G. W., Kasbekar, M., . . . Staudt, L. M. (2018). A multiprotein supercomplex controlling oncogenic signalling in lymphoma. *Nature*, *560*(7718), 387-391. doi:10.1038/s41586-018-0290-0
- Pópulo, H., Lopes, J. M., & Soares, P. (2012). The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*, *13*(2), 1886-1918. doi:10.3390/ijms13021886
- Qin, X., Jiang, B., & Zhang, Y. (2016). 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle*, *15*(6), 781-786. doi:10.1080/15384101.2016.1151581
- Rebello, R. J., Huglo, A. V., & Furic, L. (2018). PIM activity in tumours: A key node of therapy resistance. *Adv Biol Regul*, *67*, 163-169. doi:10.1016/j.jbior.2017.10.010
- Regulski, M. J. (2017). Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds*, *29*(6), 168-174.
- Riessland, M., Kolisnyk, B., Kim, T. W., Cheng, J., Ni, J., Pearson, J. A., . . . Greengard, P. (2019). Loss of SATB1 Induces p21-Dependent Cellular Senescence in Post-mitotic Dopaminergic Neurons. *Cell Stem Cell*, *25*(4), 514-530.e518. doi:10.1016/j.stem.2019.08.013
- Rizzatti, E. G., Falcao, R. P., Panepucci, R. A., Proto-Siqueira, R., Anselmo-Lima, W. T., Okamoto, O. K., & Zago, M. A. (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. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05630.x
- Rosich, L., Montraveta, A., Xargay-Torrent, S., López-Guerra, M., Roldán, J., Aymerich, M., . . . Colomer, D. (2014). Dual PI3K/mTOR inhibition is required to effectively impair microenvironment survival signals in mantle cell lymphoma. *Oncotarget*, *5*(16), 6788-6800. doi:10.18632/oncotarget.2253
- Rudolph, C., Steinemann, D., Von Neuhoff, N., Gadzicki, D., Ripperger, T., Drexler, H. G., . . . Schlegelberger, B. (2004). Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519. *Cancer Genet Cytogenet*, *153*(2), 144-150. doi:10.1016/j.cancergencyto.2004.01.006
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol*, *17*(6), 596-603. doi:10.1016/j.ceb.2005.09.009
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017a). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, *169*(2), 361-371. doi:10.1016/j.cell.2017.03.035
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017b). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, *168*(6), 960-976. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004
- Smith, S. M. (2012). Targeting mTOR in mantle cell lymphoma: current and future directions. *Best Pract Res Clin Haematol*, *25*(2), 175-183. doi:10.1016/j.beha.2012.04.008
- Song, J. H., Padi, S. K., Luevano, L. A., Minden, M. D., DeAngelo, D. J., Hardiman, G., . . . Kraft, A. S. (2016). Insulin receptor substrate 1 is a substrate of the Pim protein kinases. *Oncotarget*, *7*(15), 20152-20165. doi:10.18632/oncotarget.7918
- Sun, B., Fiskus, W., Qian, Y., Rajapakshe, K., Raina, K., Coleman, K. G., . . . Bhalla, K. N. (2018). BET protein proteolysis targeting chimera (PROTAC) exerts potent lethal activity against mantle cell lymphoma cells. *Leukemia*, *32*(2), 343-352. doi:10.1038/leu.2017.207

- Sun, B., Shah, B., Fiskus, W., Qi, J., Rajapakshe, K., Coarfa, C., . . . Bhalla, K. N. (2015). Synergistic activity of BET protein antagonist-based combinations in mantle cell lymphoma cells sensitive or resistant to ibrutinib. *Blood*, *126*(13), 1565-1574. doi:10.1182/blood-2015-04-639542
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., & Jaffe, E. S. (2017). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (Fourth Edition ed.): IARC Press Lyon, 285-290, 2017.
- Tan, C. R. C., Abdul-Majeed, S., Cael, B., & Barta, S. K. (2019). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Bortezomib. *Clin Pharmacokinet*, *58*(2), 157-168. doi:10.1007/s40262-018-0679-9
- Tarantelli, C., Bernasconi, E., Gaudio, E., Cascione, L., Restelli, V., Arribas, A. J., . . . Bertoni, F. (2018). BET bromodomain inhibitor birabresib in mantle cell lymphoma: in vivo activity and identification of novel combinations to overcome adaptive resistance. *ESMO Open*, *3*(6), e000387. doi:10.1136/esmoopen-2018-000387
- Tarantelli, C., Gaudio, E., Arribas, A. J., Kwee, I., Hillmann, P., Rinaldi, A., . . . Bertoni, F. (2018). PQR309 Is a Novel Dual PI3K/mTOR Inhibitor with Preclinical Antitumor Activity in Lymphomas as a Single Agent and in Combination Therapy. *Clin Cancer Res*, *24*(1), 120-129. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-17-1041
- Teo, A. E., Chen, Z., Miranda, R. N., McDonnell, T., Medeiros, L. J., & McCarty, N. (2016). Differential PAX5 levels promote malignant B-cell infiltration, progression and drug resistance, and predict a poor prognosis in MCL patients independent of CCND1. *Leukemia*, *30*(3), 580-593. doi:10.1038/leu.2015.140
- Tucker, C. A., Bebb, G., Klasa, R. J., Chhanabhai, M., Lestou, V., Horsman, D. E., . . . Williams, M. E. (2006). Four human t(11;14)(q13;q32)-containing cell lines having classic and variant features of Mantle Cell Lymphoma. *Leuk Res*, *30*(4), 449-457. doi:10.1016/j.leukres.2005.08.016
- Wang, M., Munoz, J., Goy, A., Locke, F. L., Jacobson, C. A., Hill, B. T., . . . Reagan, P. M. (2020). KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*, *382*(14), 1331-1342. doi:10.1056/NEJMoa1914347
- Webb, J. L. (1963). *Effect of more than one inhibitor*. In: Hochster RM, Quastel JH, editors. *Enzyme and Metabolic Inhibitors*. Vol. 1. New York: Academic Press; pp. 487-512.
- Werfel, T. A., Wang, S., Jackson, M. A., Kavanaugh, T. E., Joly, M. M., Lee, L. H., . . . Duvall, C. L. (2018). Selective mTORC2 Inhibitor Therapeutically Blocks Breast Cancer Cell Growth and Survival. *Cancer Res*, *78*(7), 1845-1858. doi:10.1158/0008-5472.Can-17-2388
- Wicki, A., Brown, N., Xyrafas, A., Bize, V., Hawle, H., Berardi, S., . . . Kristeleit, R. (2018). First-in human, phase 1, dose-escalation pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral dual PI3K and mTORC1/2 inhibitor PQR309 in patients with advanced solid tumors (SAKK 67/13). *Eur J Cancer*, *96*, 6-16. doi:10.1016/j.ejca.2018.03.012
- Xie, Y., Shi, X., Sheng, K., Han, G., Li, W., Zhao, Q., . . . Gu, Y. (2019). PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review). *Mol Med Rep*, *19*(2), 783-791. doi:10.3892/mmr.2018.9713
- Yang, G., Murashige, D. S., Humphrey, S. J., & James, D. E. (2015). A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep*, *12*(6), 937-943. doi:10.1016/j.celrep.2015.07.016

- Yuan, T., Zhang, F., Zhou, X., Li, Y., Zhang, Y., Xu, Y., & Wang, X. (2019). Inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway sensitizes diffuse large B-cell lymphoma cells to treatment with proteasome inhibitors via suppression of BAG3. *Oncol Lett*, 17(4), 3719-3726. doi:10.3892/ol.2019.10029
- Zhang, Z. H., Li, M. Y., Wang, Z., Zuo, H. X., Wang, J. Y., Xing, Y., . . . Jin, X. (2020). Convallatoxin promotes apoptosis and inhibits proliferation and angiogenesis through crosstalk between JAK2/STAT3 (T705) and mTOR/STAT3 (S727) signaling pathways in colorectal cancer. *Phytomedicine*, 68, 153-172. doi:10.1016/j.phymed.2020.153172
- Zhu, Y., Xu, W., Zheng, X., & Zheng, Z. (2019). Nomogram incorporating clinicopathological parameters to predict the survival of patients with mantle cell lymphoma. *J Investig Med*, 67(2), 331-337. doi:10.1136/jim-2018-000837
- Zou, Z., Chen, J., Yang, J., & Bai, X. (2016). Targeted Inhibition of Rictor/mTORC2 in Cancer Treatment: A New Era after Rapamycin. *Curr Cancer Drug Targets*, 16(4), 288-304. doi:10.2174/1568009616666151113120830

Abkürzungsverzeichnis

4EBP	4E-Bindungsprotein
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
AML	Akute Myeloische Leukämie
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
BCL	B-cell lymphoma
BET	Bromodomain and extraterminal domain protein
Cdc	Cell division cycle
CDK	Cyclin-dependent kinase
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermal growth factor
EIF	Eukaryotischer Translations-Initiations-Faktor
E4-BP1	EIF ₄ E-bindendes Protein 1
FCS	Fetales Kälberserum
FSC	forward scatter
GloMax-Reader	Spektrophotometer GloMax [®] Discover
HDAC	Intensive Cytarabin-haltige Induktionstherapie
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
MCL	Mantelzelllymphom
MDM	murine double minute
MEK	MAPK/ERK Kinase
mSin1	(SAPK)-interacting protein 1
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC	mTOR complex
p70S6K1	p70-S6-Kinase 1
PKD1	Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PI	Propodiumiodid
PI3K	Phosphatidyl inositol 3-kinase
Pim	Proviral integration site for Moloney murine leukemia
PIP2	Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol 4,5-Biphosphat

R-CHOP	Kombination aus Rituximab Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin und Prednison
RHEB	Ras homolog enriched in brain
SOX	SRY-related HMG-box
SSC	side scatter
TNF	Tumornekrose Faktor
TP	Tumor trotein
TSC	Tuberous-Sclerosis-Complex
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Therapieempfehlung.....	8
Abbildung 2: PI3K/AKT/mTOR und RAS/MEK/ERK Signalwege (Gurska et al., 2019)	10
Abbildung 3: Interaktion zwischen PIM-1- und PI3K/mTOR-Signalwege (Aziz et al., 2018)	14
Abbildung 4: Mantelzelllymphomzellen Granta-519, Jeko-1, Maver-1, Mino-1, Rec-1 und Z-138 nach Behandlung mit PQR309 in steigenden Konzentrationen und Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden	33
Abbildung 5: Zellviabilität der Mantelzelllymphomzellen nach Behandlung mit PQR309 nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Vi-Cell-Methode.....	34
Abbildung 6: Proliferation von Granta-519 (A) und Jeko-1 (B) nach Behandlung mit CAL101 und Temsirolimus in Monotherapie sowie in Kombination nach Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden.....	35
Abbildung 7: Proliferation von Granta-519 (A) und Jeko-1 (B) nach Behandlung mit CAL101 und KU0063794 in Monotherapie sowie in Kombination nach Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden.....	37
Abbildung 8: Zellviabilität der Granta519 (A), Jeko-1 (B) und Z-138 (C) nach Behandlung mit CAL101, Temsirolimus und KU0063794 in Monotherapie sowie in Kombination aus CAL101 mit Temsirolimus und CAL101 mit KU0063794 im Vergleich zu PQR309 nach 24 48 72 h mittels Vi-Cell-Methode	38
Abbildung 9 (A, B): MCL-Zelllinien Granta-519, Jeko1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit Niclosamid (A), Ruxolitinib (B) sowie Kombination der Therapeutika mit PRQ309 nach Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden	40
Abbildung 10 (A, B): MCL-Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit SL0101 (A) und Ibrutinib (B) sowie Kombination der Therapeutika mit PRQ309 nach Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden	41
Abbildung 11 (A, B, C): Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit PD0325901 (A), ABT199 (B), Bortezomib (C) sowie Kombination der Therapeutika mit PRQ309 nach Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden.....	43
Abbildung 12: Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit JQ1 sowie Kombination mit PRQ309 nach Analyse mittels WST- Assay nach 48 Stunden.....	44

Abbildung 13: Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit AZD1208 sowie Kombination mit PRQ309 nach Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden.....	45
Abbildung 14 (A, B): Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit AZD1208 sowie Kombination mit PRQ309 nach Analyse mittels WST-Assay nach 48 Stunden.....	46
Abbildung 15: Phasen des Zellzyklus der Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung mit PQR309	47
Abbildung 16: Phasen des Zellzyklus der Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit CAL101, Temsirolimus und KU0063794 sowie deren Kombination.....	48
Abbildung 17: Phasen des Zellzyklus der Zelllinie Granta-519 nach Behandlung in Monotherapie mit PQR309 und AZD1208 sowie deren Kombination.	49
Abbildung 18: Apoptose der Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung mit PQR309.	50
Abbildung 19: Apoptose der Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung in Monotherapie mit CAL101, Temsirolimus und KU0063794 sowie deren Kombination	51
Abbildung 20: Apoptose der Zelllinie Granta-519 nach Behandlung in Monotherapie mit PQR309 und AZD1208 sowie deren Kombination	52
Abbildung 21: Analyse der Proteinexpression der Zelllinien Granta-519, Jeko-1 und Z-138 nach Behandlung mit PQR309 nach 24 Stunden mittels Western Blot.	53
Abbildung 22: Analyse der Proteinexpression in zeitlichem Verlauf von Granta-519 nach Behandlung mit PQR309 nach 1, 4, 8 und 24 Stunden in drei Wiederholungen mittels Western Blot.....	54
Abbildung 23: Analyse der Proteinexpression von Granta-519 nach Behandlung in Monotherapie mit CAL101, Temsirolimus und KU0063794 sowie deren Kombination nach 24 Stunden mittels Western Blot.....	56
Abbildung 24: Analyse der Proteinexpression Zelllinie Granta-519 nach Behandlung in Monotherapie mit PQR309 und AZD1208 sowie deren Kombination nach 24 Stunden mittels Western Blot.....	57
Abbildung 25: Zellviabilität der Z-138 nach Behandlung mit unterschiedlichen PQR309-Konzentrationen nach 24, 48 und 72 h mittels Vi-Cell-Methode	58

Abbildung 26: Anteil von Z-Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen (A) und Anteil apoptotischer Zellen (B) nach Behandlung mit unterschiedlichen PQR309-Konzentrationen	58
Abbildung 27: p21-Protein-Level in Z-138 und Granta-519 nach Behandlung mit unterschiedlichen PQR309-Konzentrationen.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakterisierung der MCL-Zelllinien (Amin et al., 2003; Camps et al., 2006; Drexler et al., 2002; Rudolph et al., 2004): PB- peripheres Blut, LK- Lymphknoten, KM- Knochenmark, w- weiblich, m-männlich, n.a.- not available, WT- Wildtyp, M- mutiert, + Protein exprimiert, - Protein nicht exprimiert..... 27

Teilergebnisse dieser Doktorarbeit wurden veröffentlicht in:

- Kvint R., Zimmermann Y., Hutter G., Hiddemann W., Dreyling M.: High efficiency of the pan-PI3K/mTOR inhibitor, PQR-309, in MCL. *Oncology Research and Treatment*, Band 39, Suppl. 3, Oktober 2016 #P524 (Abstract)

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Martin Dreyling und meiner Betreuerin Dr. Grit Hutter für außergewöhnliche Betreuung. Sie standen mir stets mit Rat und Tat hilfsbereit zur Seite.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei der technischen Assistentin Yvonne Zimmerman, meinem Doktorandenkollegen Markus Irger und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für experimentelle Leukämie- und Lymphomforschung für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt zusätzlich meiner Familie für eure unermüdliche Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

Kvint, Rossana

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

Molekulare Therapie des Mantelzelllymphoms:

Analyse der Wirkungsweise des dualen pan-PI3K und mTOR-Inhibitor, PQR309, in Mono- und Kombinationstherapie beim Mantelzelllymphom anhand eines Zelllinienmodells

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.

Rossana Kvint

Luzern, den 10.02.2023