

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik II
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Julia Mayerle

**Einfluss der Tumormikroumgebung auf die BTK-Sensitivität des MCL -
Rolle der Kombination aus dem BTK-Inhibitor CC-292 und dem
AKT-Inhibitor MK-2206**

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

vorgelegt von
Claudia Schwandner

aus
München

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Dreyling
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Enrico De Toni
Prof. Dr. Markus Rentsch

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. Elisabeth Silkenstedt

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2025

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis	5
II. Tabellenverzeichnis	7
III. Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	12
1.1 Das Mantelzelllymphom (MCL).....	12
1.1.1 Definition und Epidemiologie	12
1.1.2 Diagnostik und Pathogenese.....	12
1.1.2.1 Histologie und Immunphänotyp	12
1.1.2.2 Zytogenetik und Molekulargenetik.....	14
1.1.3 Prognostische Faktoren	14
1.1.4 Therapie des MCL	14
1.1.4.1 Immunchemotherapie	15
1.1.5 Der B-Zell-Rezeptor Signalweg.....	15
1.1.6 Zielgerichtete Therapeutika	17
1.1.6.1 Spebrutinib (CC-292/AVL-292).....	17
1.1.6.2 MK-2206 HCl	17
1.2 Das Tumormikroenvironment.....	17
2 Ziele dieser Arbeit	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.1.1 Zelllinien	20
3.1.2 Zellkultur.....	20
3.1.3 Inhibitoren	21
3.1.4 Software	21
3.1.5 Durchflusszytometrie.....	22
3.1.6 MACS	22
3.1.7 Western Blot.....	22
3.1.8 Transfektion.....	24
3.1.9 Antikörper.....	24
3.1.10 Selbthergestellte Reagenzien und Puffer	25
3.1.11 Geräte	26

3.2	Methoden.....	28
3.2.1	Zellkultur.....	28
3.2.1.1	MCL-Zelllinien	28
3.2.1.2	Feederlayer-Zellen	28
3.2.2	Zellansätze	28
3.2.3	Zellbiologische Methoden.....	30
3.2.3.1	Zellzählung	30
3.2.3.2	WST-1 Assay.....	30
3.2.3.3	Durchflusszytometrie mit FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)	31
3.2.3.4	MACS (Magnetic Activated Cell Sorting).....	31
3.2.3.5	Fraktionierung.....	33
3.2.3.6	Western Blot	34
3.2.3.7	siRNA Transfektion mittels Nukleofektion.....	36
3.2.4	Statistische Analysen	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe.....	38
4.1.1	Sensitivität etablierter MCL-Zelllinien gegenüber der Therapie mit dem BTK-Inhibitor CC-292	38
4.1.2	Einfluss der Tumormikroumgebung auf die MCL-Zellen	38
4.2	Bedeutung der Zell-Zell-Interaktion für die Sensitivität gegenüber CC-292.....	41
4.3	Evaluation der Expression von pAKT und seines Downstream-Targets FOXO1	42
4.4	Abhängigkeit des Einflusses der Tumormikroumgebung auf die Sensitivität von MCL-Zelllinien gegenüber CC-292 von der Regulation der pAKT-Expression	45
4.4.1	Etablierung eines geeigneten Transfektion-Verfahrens.....	45
4.4.2	Evaluation der Effektivität einer siRNA vermittelten AKT Inhibition.....	46
4.4.3	Hemmung der AKT-Überexpression in der MCL-Stromazell-Ko-Kultur durch siRNA.....	47
4.5	Kombination von CC-292 mit dem AKT Inhibitor MK-2206.....	48
4.5.1	Wirkung von MK-2206 auf die pAKT Expression	49
4.5.2	Effektivität der kombinierten BTK & AKT-Inhibitor Therapie zur Überwindung der Stromazell-induzierten CC-292 Resistenz im MCL.....	51
4.5.3	Untersuchung des Einnistungsverhaltens der MCL-Zellen unter der Therapie mit MK-2206	53

4.6	Expression des AKT-Downstream-Targets FOXO1 unter der Therapie mit MK-2206..	53
4.7	Apoptoseinduktion durch die Kombinationstherapie mit CC-292 und MK-2206....	55
5	Diskussion	57
5.1	Einfluss der Tumormikroumgebung auf die MCL-Zellen	57
5.2	Bedeutung des AKT-Downstream Targets FOXO1	59
5.3	AKT als Mediator der Tumormikroumgebung-vermittelten Reduktion der Sensitivität gegenüber CC-292.....	59
5.4	FOXO1-Reaktivierung durch AKT-Hemmung über MK-2206.....	61
6	Zusammenfassung.....	63
7	Literatur	65
8	Eidesstattliche Versicherung	74
9	Bisherige Veröffentlichungen	75
10	Danksagung.....	76

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellmorphologien des MCL.....	12
Abbildung 2: Wachstumsmuster	13
Abbildung 3: MCL Typen nach WHO 2016.....	13
Abbildung 4: Transwell	29
Abbildung 5: MACS-Aufbau	32
Abbildung 6: BIM Expression nach MACS zum Nachweis der MCL-Reinkultur	33
Abbildung 7: FACS nach MACS zum Nachweis der MCL-Reinkultur.....	33
Abbildung 8: Western Blot	36
Abbildung 9: Therapieansprechen verschiedener MCL-Zelllinien auf CC-292	38
Abbildung 10: MCL in Mono- und Ko-Kultur auf HS-5 mit 5µM CC-292.....	39
Abbildung 11: Z-138 in Mono- und in Ko-Kultur mit HS-5	40
Abbildung 12: MCLs Z-138 und JeKo-1 in Mono- und Ko-Kultur auf HS-5 mit 5µM CC292	41
Abbildung 13: MCL mit 5µM CC-292 0,4µm Insert vs. direkter Zell-Zell-Kontakt	42
Abbildung 14: Z-138 und JeKo-1 Mono- und Ko-Kultur mit HS-5 24h nach CC-292 (5µM) Behandlung	42
Abbildung 15: Z-138 und JeKo-1 in Mono- und Ko-Kultur auf HS-5	44
Abbildung 16: Z-138 in Mono- und Ko-Kultur auf HS-5.....	45
Abbildung 17: Proteinanalyse 48h nach Transfektion mit AKT-siRNA und Kontroll-siRNA	46
Abbildung 18: JeKo-1: Western Blot 24/48/72h nach si-Transfektion	46
Abbildung 19: JeKo-1 Proliferation 72h nach si-Transfektion und 24-stündiger CC-292-Behandlung	48
Abbildung 20: Western-Blot mit AKT und pAKT Proteinexpressionen.....	48
Abbildung 21: Proliferation JeKo-1 und Z-138 nach Behandlung mit unterschiedlichen Konz. MK-2206.....	49
Abbildung 22: Dosisfindung MK-2206, 24h nach MK-2206-Behandlung unterschiedlicher Konzentrationen.....	50
Abbildung 23: Zeitreihe mit 1µM MK-2206 und pAKT und AKT Proteinexpression 2, 6 und 24h nach Behandlung.....	50
Abbildung 24: Z-138 und JeKo-1 in Mono- und Ko-Kultur, Kombinationsbehandlung mit 5µM CC-292 und 1µM MK-2206	52
Abbildung 25: Z-138 und JeKo-1 in Mono- und Ko-Kultur 48h nach Kombinationstherapie mit 5µM CC-292 und 1µM MK-2206.....	52

Abbildung 26: Anteil eingesteter (SET) MCLs zu MCLs im Überstand (SN) in Ko-Kultur.....	53
Abbildung 27: FOXO1 Expression nach Behandlung mit 1 μ M MK-2206	54
Abbildung 28: FOXO1-Expression	55
Abbildung 29: Apoptoserate von Z-138 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle Z 48h nach 1 μ M MK-2206 bzw. 5 μ M CC-292 Behandlung und FACS-Analyse	56

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellkultur-Ansätze Übersicht.....	29
Tabelle 2: Menge des Mediums in ml.....	30
Tabelle 3: Zusammensetzung der Elektrophorese-Gele	35
Tabelle 4: siRNA-Sequenzen	36

III. Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
7-AAD	7-Aminoactinomycin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
ASCT	autologe Stammzelltransplantation (autologous stem cell transplantation)
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Allgemeinzustand
BAD	Protein der BCL2 Familie (BCL2 associated agonist of cell death)
BAFF	Zytokin (B-cell activating factor)
BLNK	Adapterprotein (B-cell linker protein)
BR	Bendamustine + Rituximab
BTK	Brutons Tyrosin Kinase
BCR	B-Zell Rezeptor (B-cell receptor)
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ²	Calciumdichlorid
CB	Chromatin gebunden (chromatin bound)
CCND1	Proto-Onkogen für Cyclin D1
CD	Oberflächenmarker (Cluster of differentiation)
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
CEB	Zytoplasma-Extraktions-Puffer (cytoplasmic extraction buffer)
cHL	klassisches Hodgkin Lymphom (classical Hodgkin lymphoma)
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CP	im Zytoplasma (cytoplasma)
CSF-1/M-CSF	Zytokin (macrophage colony stimulating factor)
CXCL	Chemokin (C-X-C motif ligand)
CXCR	Chemokin Rezeptor (CXC chemokine receptor)
DAG	Diacylglycerin
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (Diffuse large B-cell lymphoma)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECL	Enhanced chemoluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group Performance-Status
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (European Medicines Agency)
ERK	Kinase (extracellular-signal regulated kinases)
ESMO	Europäische Gesellschaft für Medizinische Onkologie (European Society for Medical Oncology)
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting)
FAK	Adhäsions Kinase (focal adhesion kinase)
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FKS/FBS	Fetales Kälberserum (fetal bone serum)
FL	Feederlayer
Fl.	Flaschen
FOXO	Transkriptionsfaktor (Forehead Box Protein 0)
Grb2	Adapterprotein (growth factor receptor-bound protein 2)

GSK-3	Kinase (Glycogen synthase kinase 3)
HL	Hodgkin Lymphom
Ig	Immunglobulin
IGHV	Schwere-Ketten-Antikörper Gen (immunoglobulin heavy chain gene)
IL	Interleukin
IP3	Signalmolekül (Inositoltrisphosphate 3)
IUPAC	IU für reine und angewandte Chemie (International Union of Pure and Applied Chemistry)
ITAM	Rezeptorkomplex-Anteil (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
KM	Knochenmark
Konz.	Konzentration
LDH	Laktatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
L-NN	leukämisch nicht-nodal (leukemic nonnodal)
Lyn	Tyrosinkinase
MACS	Magnetische Zellseparation (Magnetic cell separation)
MAPK	Kinase (mitogen-activated protein kinase)
MCL	Mantelzelllymphom (mantle cell lymphoma)
MEB	Membran-Extraktions-Puffer (membrane extraction buffer)
MEK	MAPK-aktivierende Kinase (mitogen-activated protein kinase kinase)
Min	Minute
MIPI	mantle cell lymphoma international prognostic index
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NEB	Kern-Extraktions-Puffer (nuclear extraction buffer)
NFκB	Transkriptionsfaktor (nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells)
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (non small cell lung carcinoma)
NW	Nebenwirkungen
OS	Gesamtüberleben (overall survival)
p21	Protein 21/ CDK-Inhibitor1
p27	CDK-Inhibitor 1B/CDKN1B
p70S6 Kinase	Proteinkinase S6K1 (Ribosomal protein S6 kinase beta-1)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDK1	Phosphoinositid abhängige Kinase (Phosphoinositide-dependent kinase-1)
PDK2	Pyruvatdehydrogenasekinase 2 (Pyruvate dehydrogenase kinase-2)
PFS	Progressionsfreies Überleben (progression-free survival)
PH-Domäne	Pleckstrin homology-Domäne
PI3K	Phosphoinositid 3 Kinase
PIP2	zellmembranständiges Phospholipid (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat)
PIP3	zellmembranständiges Phospholipid (Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat)
PKB	Proteinkinase B (AKT)
PKC	Proteinkinase C
PLCy2	Phospholipase C(γ2)
PTEN	Tumorsuppressor-Phosphatase (phosphatase and tensin homolog)
Raf	Kinase (rapidly accelerated fibrosarcoma)
Ras	Protoonkogen (p21/ rat sarcoma)
RB	Retinoblastom-Gen

R-CHOP	Rituximab + Cyclophosphamid + Doxorubicin + Vincristin + Prednison
R-DHAP	Rituximab + Dexamethason + hochdosiertes Cytarabin(Ara-C) + Cisplatin
REAL	REAL-Klassifikation (Revised European-American Lymphoma Classification)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
Rpm	Rounds per Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
R/R	Rezidiv (relapsed/ refractory)
RT	Raumtemperatur
SCT	Stammzelltransplantation (stem cell transplantation)
Sek	Sekunden
Ser473	Serin 473
SET	eingenistete Zellen (settled)
SH2	SH2-Domäne
siRNA	kleine eingreifende RNA (Small interfering RNA)
SN	Zellen im Überstand (supernatant)
Sol	soluble
SOX11	SRY-Box Transkriptionsfaktor 11
Src	Tyrosinkinase (sarcoma)
Syk	Tyrosinkinase (spleen tyrosin kinase)
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
Thr308	Threonin 308
TME	Tumormikroenvironment/Tumormikroumgebung
Tyr	Tyrosin
Vav	Proteinfamilie aus Austauscher für Rho-GTPasen
VR-CAP	Bortezumib + Rituximab + Cyclophosphamid + Doxorubicin + Prednisolon
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
WST	water soluble tetrazolium

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird im Folgenden auf die gleichzeitige Verwendung weiblicher, männlicher und diverser Sprachformen verzichtet und das generische Maskulinum verwendet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.

1 Einleitung

1.1 Das Mantelzelllymphom (MCL)

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das Mantelzelllymphom gehört zu den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL) und macht etwa 5-7% aller B-NHL aus.

Es wurde zunächst von Karl Lennert in den 1970er Jahren im Rahmen der Kiel-Klassifikation unter dem Namen „Zentrozytisches Lymphom“ beschrieben, für das erstmalig 1992 von Banks et al. der Begriff „Mantelzelllymphom“ vorgeschlagen wurde (1). Seit 1994 wird es in der R.E.A.L-Klassifikation und seit 2001 in der auf ihr beruhenden WHO-Klassifikation (2) unter der bis heute gültigen Entität „Mantelzelllymphom“ charakterisiert.

Mantelzelllymphome treten mit einer Inzidenz von 2-3/100.000 Einwohner pro Jahr auf. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 65 Jahren, wobei Männer in einem Verhältnis von 3:1 deutlich häufiger erkranken als Frauen (3). Im Verlauf der letzten Jahrzehnte konnte ein Anstieg der Inzidenz beobachtet werden. In einer großen US-Studie zwischen 1992 und 2004 stieg sie um 6%, wobei diese Zunahme vor allem in der Anzahl der Stadium IV Erkrankungen zu verzeichnen war (4). Auch in den folgenden Jahren konnte weiterhin ein Inzidenz-Anstieg beobachtet werden (5, 6).

1.1.2 Diagnostik und Pathogenese

1.1.2.1 Histologie und Immunphänotyp

Um das MCL zu diagnostizieren erfolgen histologische sowie immunhistochemische Untersuchungen. Die klassische Zellmorphologie imponiert als klein- bis mittelgroße Zelle mit eingekerbtem Kern. Zusätzlich zur klassischen MCL-Variante lassen sich zytologisch noch weitere Zellarten (kleinzellig/ blastoid/ pleomorph) [Abb.1] unterscheiden, die auch als Mischformen auftreten können (7).

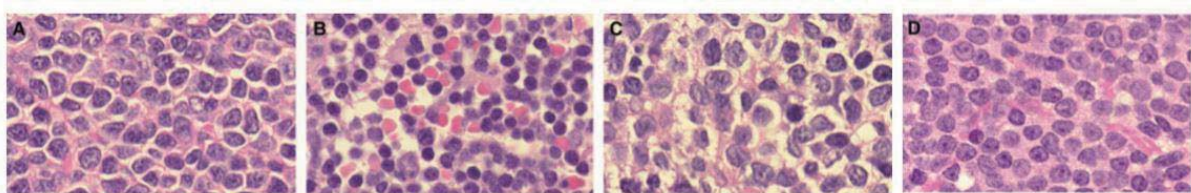


Abbildung 1: Zellmorphologien des MCL: A) klassisch B) kleinzellig C) pleomorph D) blastoid (7)

Des Weiteren können auch verschiedene Wachstumsmuster voneinander abgegrenzt werden, die sich in diffuse, noduläre und Mantelzonen-Muster einteilen lassen (8). In mehreren Studien wurde deutlich, dass der Großteil der MCL mit diffusem Wachstumsmuster imponiert (ca. 60-80%) und nur sehr vereinzelt der Mantelzonen-Typ dominiert (ca. 1-10%) (7–9).

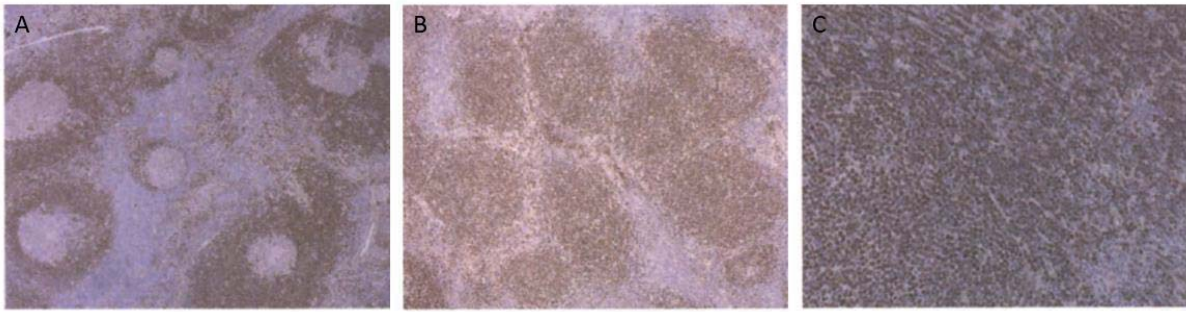


Abbildung 2: Wachstumsmuster: A) Mantelzonen-Muster B) nodulär C) diffus (10)

Der Immunphänotyp der neoplastischen Zellen ähnelt dem reifer B-Lymphozyten in der Mantelzone normaler Keimfollikel und ist gekennzeichnet durch eine Expression der Cluster of Differentiation (CD) Antigene CD19, CD20 und CD79a bei aberranter und diagnostisch richtungsweisender Koexpression des T-Zell-Antigens CD5. Im Gegensatz zur chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) zeigen die Tumorzellen jedoch keine CD23-Expression. Diagnostisch entscheidend ist die konstitutionelle Cyclin-D1-Überexpression. Selten sind Cyclin-D1-negative Fälle, die eine Überexpression von Cyclin D2 oder Cyclin D3 aufweisen. Zum Nachweis seltener CyclinD1-negativer MCL-Fälle dient weiterhin der Nachweis des neuralen Transkriptionsfaktors SOX11 (11). SOX11 wird nicht in anderen B-Zell-Lymphomen exprimiert und dient somit als spezifischer Marker für das MCL (12). Dass SOX11 mittlerweile eine große Bedeutung in der Diagnostik des Mantelzelllymphoms hat, wird auch anhand der WHO Definition von 2016 deutlich. Hier erfolgt die Unterscheidung zwischen dem klassischen Mantelzelllymphom (cMCL) mit unmutiertem Schwere-Ketten-Antikörper Gen (IGHV= immunoglobulin heavy chain gene) und SOX11-Expression und dem leukämischen nicht-nodalen MCL mit mutiertem IGHV und SOX11-Negativität (13). Diese Subgruppe der Mantelzelllymphome zeichnet sich durch einen eher indolenten klinischen Verlauf aus, wobei eine leukämische Ausschwemmung mit Splenomegalie und niedrigem Proliferationsindex charakteristisch sind. Abbildung 3 zeigt die typische Lokalisation der beiden MCL-Typen und gibt eine erneute Übersicht über die bereits beschriebenen Besonderheiten.

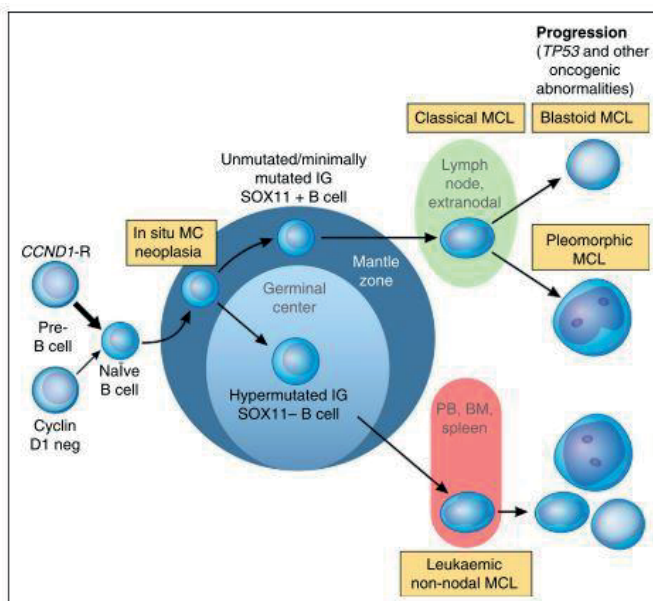


Abbildung 3: MCL Typen nach WHO 2016; klassisches vs. indolentes MCL (13)

1.1.2.2 Zytogenetik und Molekulargenetik

In der Pathogenese des MCL spielt die charakteristische Translokation t(11;14) (q13/q32), die zu einer Aktivierung des Protoonkogens *CCND1* führt, eine entscheidende Rolle. Da *CCND1* für das Zellzyklus-Protein Cyclin D1 codiert, wird dieses vermehrt exprimiert (14). Dies hat eine Dysregulation des Zellzyklus zur Folge (15). Zur Diagnosesicherung ist ein immunhistochemischer Nachweis der Cyclin D1 Überexpression oder ein Nachweis der t(11;14) Translokation mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) obligat (3).

Zusätzlich finden sich häufig weitere sekundäre genetische Alterationen, die mit einer gestörten Zellzyklusregulation und veränderten DNA-Reparaturmechanismen assoziiert sind (z.B. Deletionen in den Chromosomen 9p21 (*p15* und *p16*), 11q22-23 (*ATM*), 17p (*p53*-Inaktivierung) etc.) Rekurrente somatische Mutationen betreffen neben *CCND1* (~7-35%) u.a. *WHSC1* (~10%), *KMT2D/MLL2* (~14-15%), *BIRC3*, *MEF2B*, *NOTCH1/2* (alle <10%) (16, 17). Die prognostisch/prädiktive Bedeutung und funktionelle Relevanz ist in vielen Fällen noch unklar und Gegenstand aktueller Untersuchungen. Genmutationen, die mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert sind, betreffen z.B. *TP53* und *NOTCH1/2* (16, 18).

1.1.3 Prognostische Faktoren

Zur Risikoeinschätzung wurden im letzten Jahrzehnt zwei prognostische Indices etabliert. Der „mantle cell lymphoma international prognostic index“ (MIPI), welcher klinische Werte untersucht, und der „Ki-67-Index“, der als Proliferations-Marker fungiert. Im MIPI werden Alter, ECOG Status des Patienten, Lymphozyten-Zellzahl, sowie der Laktatdehydrogenase (LDH) Wert des Blutes bewertet. Hiermit können die MCL-Patienten in drei prognostische Gruppen, mit niedrigem-, mittlerem- und hohem Risiko eingeteilt werden (19). Als prognostisch relevant wurde der Nachweis > 30% Ki-67-positiver Lymphomzellen definiert (20, 21). Um beide Indices zu verbinden wurde der MIPIc etabliert, der für die MIPI-Gruppen je 0, 1 bzw. 2 Punkte und für Ki-67 >30% ebenfalls 1 Punkt vergibt. Hoster et al. konnten zeigen, dass sich hieraus vier prognostische Gruppen ergeben, die eine präzisierte Aussage über die Prognose von MCL-Patienten ermöglichen (9).

1.1.4 Therapie des MCL

Die Herausforderung in der Therapie des MCL liegt in der komplexen Pathogenese, sowie in dem heterogenen klinischen Verlauf (22, 23). Da das mediane Erkrankungsalter bei über 65 Jahren liegt, müssen oft Allgemeinzustand und Komorbiditäten in die Therapieentscheidung mit einbezogen werden (24).

Für indolente Krankheitsverläufe wird derzeit eine „watch&wait“-Strategie empfohlen (25). Retrospektiv konnte evaluiert werden, dass Patienten mit non-nodaler Präsentation (L-NN-MCL) (26), gutem Allgemeinzustand, asymptomatischem Krankheitsbild, geringem Lymphknoten(LK)-Befall, niedriger LDH und niedriger Proliferationsrate von dieser Option profitieren (27).

Der Großteil der am Mantelzelllymphom erkrankten Patienten weist allerdings bei Diagnosestellung schon ein fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung auf (5).

Eine weitere Aufteilung der Patientengruppen erfolgt nach Alter. Die Altersgrenze liegt, wie auch in den ESMO(Europäische Gesellschaft für Onkologie)-Guidelines von 2017 aufgeführt, bei 65 Jahren (3).

1.1.4.1 Immunchemotherapie

Das Therapiekonzept junger Patienten beinhaltet eine intensiviertere Induktionschemoimmuntherapie mit autologer Stammzelltransplantation (ASCT) je nach Risikoprofil sowie anschließender Erhaltungstherapie mit Rituximab für weitere 3 Jahre (28). Bisher galten je 3 Zyklen R-DHAP (Rituximab + Dexamethason + hochdosiertes Cytarabin + Cisplatin) im Wechsel mit R-CHOP (Rituximab + Cyclophosphamid + Doxorubicin + Vincristin + Prednisolon) als Standard (29). Neuste Ergebnisse der internationalen „Randomized Mantle Cell Lymphoma Younger Trial“ zeigen ein besseres Ansprechen sowie ein längeres Gesamtüberleben durch die Ergänzung von R-DHAP und eine cytarabinhaltige Hochdosistherapie vor ASCT (30). Aktuelle Empfehlungen ergänzen außerdem Ibrutinib zu R-CHOP (R-CHOP-I) und als Kombination zu Rituximab für 2 Jahre während der Erhaltungstherapie. Die Ergebnisse einer internationalen Phase III Studie, die das Standard R-CHOP/R-DHAP Regime mit R-CHOP-I/R-DHAP und mit R-CHOP-I/R-DHAP ohne ASCT verglich, zeigten eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberleben in den Ibrutinib-Armen mit und ohne ASCT nach 36 Monaten (86% vs. 91/92% Monate) (31).

Die Therapie der älteren Patientengruppe über 65 Jahren erfolgt mit Rituximab + Chemotherapie (3). Bisher galten R-CHOP oder eine Kombinationstherapie aus Bendamustine und Rituximab (BR) als Standard (25). Aktuell stellt VR-CAP (Bortezomib + Rituximab + Cyclophosphamid + Doxorubicin + Prednisolon) den neuen Therapiestandard dar. Die Ergebnisse einer internationalen Phase III Studie, die das Standard R-CHOP Regime mit VR-CAP verglich, zeigten eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberleben im VR-CAP Arm nach 82 Monaten (90,7 vs. 45,7 Monate) (32). In dieser Patientengruppe sollte die Weiterbehandlung mit Rituximab Erhaltungstherapie erfolgen (24).

In der Rezidiv-Behandlung werden zusätzlich zu den konventionellen Immunchemotherapien auch zielgerichtete Therapien, u.a. mit Wirkung im B-Zell-Rezeptor-Signalweg angewendet. Hierzu gehören beispielsweise der Proteasom-Inhibitor Bortezomib, der mTor (Mammalian Target of Rapamycin) -Inhibitor Temsirolimus, der Immunmodulator Lenalidomid und der BTK-Inhibitor Ibrutinib, welche bereits von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) für das rezidierte/refraktäre MCL zugelassen wurden (25, 33).

Durch ein zunehmendes Verständnis der für die Pathogenese des MCL relevanten Signalwege konnte eine Vielzahl neuer Therapien entwickelt werden. Auch im Hinblick auf diese Arbeit spielt der B-Zell-Rezeptor (BCR)-Signalweg dabei eine wichtige Rolle und soll deshalb genauer dargestellt werden.

1.1.5 Der B-Zell-Rezeptor Signalweg

Der B-Zell-Rezeptor besteht aus einem IgM Immunglobulin, an welches ein Heterodimer mit den Ig α und Ig β Domänen CD79a und CD79b gebunden ist. Die Untereinheiten CD79a/b dienen, in Form einer Immunrezeptor Tyrosin-vermittelten Aktivierungs-Einheit (ITAM), der Signalweiterleitung (34). In Folge einer Antigen-Bindung am BCR werden die

zytoplasmatischen ITAM-Regionen von der src-Familien-Protein-Tyrosinkinase Lyn (35) durch Phosphorylierung aktiviert. Dadurch kann die Tyrosinkinase Syk über seine SH2-Domäne an ITAM gebunden und aktiviert werden und löst einen positiven Feedbackloop und weitere ITAM-Aktivierung aus (36). Syk und Lyn bilden mit weiteren Kinasen und Proteinen den initialen Komplex im BCR-Signalweg, das Signalosom. Hierzu gehören Proteine der Vav-Austauscherproteinfamilie, sowie die beiden Adapterproteine Grb2 (growth factor receptor-bound) und BLNK (B-cell linker-Protein) und die Brutons Tyrosin Kinase (BTK) (34). Das Gerüstprotein BLNK rekrutiert BTK durch seine SH2 Domäne, wodurch die Tyrosinkinase von Syk phosphoryliert und aktiviert wird (37). Ein zusätzlicher Mechanismus der BTK-Aktivierung erfolgt auch über das Phospholipid PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat). Durch die aktivierten Kinasen BTK und Syk wird die Phospholipase C- γ 2 (PLC γ 2) aktiviert (38). PLC γ 2 führt über mehrere Signalkaskaden zur Proliferationssteigerung. Das Phospholipid PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) wird zum Signalmolekül IP3 (Inositol trisphosphate 3) und zu Diacylglycerin (DAG) hydrolysiert. Über IP3 wird ein Intrazellulärer Calcium(Ca^{2+})-Anstieg bewirkt, der mit DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (39). Außerdem induziert die Phospholipase wichtige Mechanismen des Zellüberlebens durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells) und des MAPK(mitogen-activated protein kinase)-Signalweges (40). Somit ist BTK, indirekt über die Phospholipase C, ein wichtiger Knotenpunkt, der zur Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren führt.

Eine weitere wichtige Kinase im B-Zell-Rezeptor Signalweg ist AKT, auch Proteinkinase B (PKB) genannt. Es sind 3 humane Isoformen AKT1/PKB α , AKT2/PKB β und AKT3/PKB γ bekannt. PKB ist eine Serin/Threonin Kinase mit einer N-terminalen PH (pleckstrin homology)-Domäne (41). Sie besitzt zwei regulatorische Phosphorylierungsstellen, eine Threonin308 (Thr308) Stelle im 'activation loop' der Kinasen-Domäne und die Serin473 (Ser473) Stelle in der C-terminalen Regulations-domäne (42). Die AKT Aktivierung erfolgt über mehrere Schritte. PIP3 induziert eine Konformationsänderung (für PDK1) und die Bindung der Kinase an die Plasmamembran. Anschließend kann die PI3K(Phosphoinositid-3-Kinase)-abhängige Kinase 1 (PDK1) AKT an Thr308 phosphorylieren. Ser473 wird über die Kinase PDK2 (Pyruvate dehydrogenase kinase 2) phosphoryliert (43). Aktiviertes AKT trägt erheblich zur Tumorphagenese bei. Über Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) und CDK-Inhibitoren, wie p21(CDK-Inhibitor1) und p27(CDK-Inhibitor 1B/CDKN1B), reguliert es den Zellzyklus und führt zu gesteigerter Proliferation. Außerdem wird beispielsweise über Hemmung von GSK-3 (Glycogen synthase kinase 3) der Glukosestoffwechsel und über Hemmung von BAD (BCL2 associated agonist of cell death) die Apoptose interferiert (44, 45). Zwei weitere wichtige Downstream-Faktoren sind mTOR und FOXO (Forkhead box transcription factors) (43). Die Kinase mTOR führt, unter anderem über den mTOR/p70S6- Kinase Signalweg, zu einer Induktion von Zellwachstum und Proliferation (46). FOXO sind eine Familie von Transkriptionsfaktoren mit anti-proliferativen und pro-apoptotischen Eigenschaften, die über drei AKT-Phosphorylierungsstellen mit der PKB verknüpft sind (47). AKT führt durch die Phosphorylierung von FOXO zu dessen Transport aus dem Zellkern, wodurch seine Funktion als Transkriptionsfaktor inhibiert wird (48). In hämatopoetischen Zellen kommen v.a. FOXO1/3 vor, wobei in B-Zellen FOXO1 eine wichtige Rolle spielt (49).

Der B-Zell-Rezeptor Signalweg besteht noch aus einer Vielzahl weiterer Signalkaskaden und Mediatoren, auf die hier nicht im Einzelnen weiter eingegangen werden soll. Dennoch verdeutlichen die Komplexität des B-Zell-Rezeptor Signalwegs und seine Relevanz für die Pathogenese des MCL, dass jeder weitere Erkenntnisgewinn über molekulare Mechanismen des BCR zur Regulation von Entstehung und Progression des MCL in molekularem Verständnis des Mantelzelllymphoms und Entwicklung neuer Therapien ist.

1.1.6 Zielgerichtete Therapeutika

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren verschiedener Kinasen des B-Zellrezeptorsignalwegs näher beschrieben werden.

1.1.6.1 Spebrutinib (CC-292/AVL-292)

Spebrutinib ist ein oraler selektiver Brutons-Tyrosinkinase-Inhibitor, der von „Avila Therapeutics“ entwickelt und von „Celgene“ übernommen wurde. Die chemische Bezeichnung lautet N-(3-(5-fluoro-2-(4-(2-methoxyethoxy)phenylamino)pyrimidin-4-ylamino)phenyl)acrylamide und die Formel $C_{22}H_{22}FN_5O_3$. CC-292 ist ein sehr selektiver BTK-Inhibitor, da er eine hohe Affinität zur ATP(Adenosintriphosphat)-Bindestelle von BTK hat und kovalent an das Cystein 481 bindet. Dadurch wird die Autophosphorylierung von BTK gehemmt. Allerdings bleibt die Tyrosin-551 Stelle aktiv und BTK kann dadurch von Syk und Lyn weiterhin phosphoryliert werden (50). Es konnte gezeigt werden, dass CC-292 die CD69 Expression, einen Marker für die B-Zell-Aktivität, hemmt (51). Aktuell befindet sich Spebrutinib in Phase II Studien zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis (52) und Phase I Studien zur Behandlung von Lymphomen. Hierbei erfolgten vor allem Studien in der CLL Behandlung (53). Da Ibrutinib bereits erfolgreich als BTK-Inhibitor beim MCL eingesetzt wird, könnte in Zukunft auch Spebrutinib eine Rolle in der Behandlung des MCL spielen (54).

1.1.6.2 MK-2206 HCl

Der pan-AKT Inhibitor MK-2206 hemmt alle AKT-Isoformen AKT 1/2/3 über Inhibition der Kinasen-Phosphorylierung sowohl am Serin als auch am Threonin Rest. Er ist sehr potent und selektiv wirksam, wobei gegen AKT1&2 eine höhere inhibierende Wirkung als gegen AKT-3 besteht. MK-2206 ist ein allosterischer Inhibitor mit der chemischen IUPAC (Internationale Union für reine und angewandte Chemie) Bezeichnung 8-[4-(1-Aminocyclobutyl)phenyl]-9-phenyl-1,2,4-triazolo[3,4-f][1,6]naphthyridin-3(2H)-onehydrochloride und der chemischen Formel $C_{25}H_{21}N_5O$ (55). Aktuell wird er vor allem in Studien zur Therapie solider Tumoren der Mamma, Lunge, Ovarien oder auch Prostata eingesetzt (56). Aber beispielsweise auch in Diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) und refraktären bzw. resistenten Lymphomen wurde seine Anwendung in verschiedenen Studien getestet, da AKT als Target des B-Zell-Rezeptor-Signalweges hierbei eine wichtige Rolle spielt (57, 58). Bezüglich seiner Toxizität konnte MK-2206 sowohl in einer ersten Studie zur Untersuchung der Wirkstoffsicherheit als auch in neueren Studien eine gute Verträglichkeit nachgewiesen werden (56, 59).

1.2 Das Tumormikroenvironment

Das Tumormikroenvironment (Tumormikroumgebung – TME) spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese und Progression von Malignomen. Dieser Begriff bezeichnet die Umgebung der

Tumorzellen, wie beispielsweise das Knochenmark und lymphatische Gewebe bei Lymphomen. Durch direkten Zell-Zell-Kontakt, Sekretion von Zytokinen und Antigenen und Einfluss auf den B-Zell-Rezeptor, werden Signalkaskaden in Gang gesetzt, Angiogenese und Inflammation gesteigert und somit eine fördernde Wirkung auf Tumorstadium und Medikamenten-Resistenz induziert (60). Die Tumormikroumgebung der Lymphome kann in vier Gruppen unterteilt werden:

1. Immunzellen (z.B. zytotoxische T-Zellen, B-Helferzellen, natürliche Killerzellen)
2. Stroma Zellen (mesenchymale Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen, myeloide Zellen)
3. Angiogenese
4. Extrazelluläre Bestandteile (Extrazelluläre Matrix, Zytokine/Chemokine, Exosomen) (61)

Auch in der Pathogenese des Mantelzelllymphoms spielt seine Tumormikroumgebung eine wichtige Rolle. Durch zahlreiche Interaktionen führt es bei den MCL-Zellen zu gesteigerter Proliferation, verbessertem Überleben und Resistenz gegenüber Therapeutika (62).

Ein Mechanismus beruht auf einer Aktivierung des B-cell-activating factors BAFF und des NFκB Signalweges durch Stromazellen der Tumormikroumgebung. Über BAFF werden die Chemokine CXCL12 & CXCL13 verstärkt aktiviert, was über ihre Liganden 4/5 zu Chemotaxis führt (63). Auch die 'focal adhesion kinase' FAK hat in Verbindung mit dem Bindegewebe und dessen Zellen, über Aktivierung von AKT, den MAP Kinasen p42/44 und NF-κB und daraus folgende Signalkaskaden steigernde Effekte auf Proliferation und Zellüberleben (64).

Sabas et al. konnten zeigen, dass MCL-Zellen in der Tumormikroumgebung der Lymphknoten eine Aktivierung des B-Zell-Rezeptors und des NFκB Signalwegs aufweisen. Dies steht in direktem Zusammenhang mit erhöhter Lymphom-Proliferation und ungünstiger Prognose. Diese wird hierbei zusätzlich durch eine NF-κB-induzierte Ibrutinib Resistenz verstärkt (65).

Die ungünstigere Prognose von SOX11+ MCL-Subtypen kann durch Interaktion mit der Tumormikroumgebung erklärt werden. SOX11 aktiviert direkt die Transkription von CXCR4 und FAK. CXCR4 und CXCL12, das von Stromazellen des Knochenmarks (KM) sezerniert wird, verstärken die FAK Aktivierung. Dies führt zu MCL-Migration und Adhäsion in LK und KM und daraus resultierender Interaktion mit den Gewebszellen, die zu gesteigertem Überleben und Therapieresistenz führt. SOX11-abhängig werden PI3K/AKT- und ERK (extracellular-signal regulated kinases)1/2-FAK Signalwege aktiviert, was wiederum zu Tumormikroumgebungs-induzierter Proliferation, Überleben und Chemoresistenz führt (66). Auch Tumorassoziierte Makrophagen (TAM) spielen eine Rolle. Hierbei wird durch die MCL-Zellen selbst Interleukin(IL)-10 und colony stimulating factor 1 (CSF-1) sezerniert. Dies aktiviert die TAMs aus Monozyten und führt ebenfalls zu verbessertem Lymphom-Überleben und gesteigerter Proliferation (67).

Hieraus wird ersichtlich, dass die Tumormikroumgebung eine wichtige Rolle für die Tumorgenese- und progression des MCL spielt. Erste Erkenntnisse eröffnen bereits Möglichkeiten neuer Therapiekonzepte (68). Doch trotz Kenntnis einiger Signalkaskaden sind noch ein Großteil der zugrundeliegenden Prozesse unbekannt (67) und die weitere Forschung in diesem Bereich ist von großer Wichtigkeit.

2 Ziele dieser Arbeit

Trotz zunehmender Fortschritte in der Behandlung des Mantelzelllymphoms und der Etablierung neuer zielgerichteter Therapien ist der klinische Verlauf von Patienten mit MCL sehr heterogen und oft durch rasche Rezidive gekennzeichnet. Insbesondere Patienten, die auf eine Therapie mit dem BTK-Inhibitor Ibrutinib resistent sind, weisen einen deutlich schlechteren Krankheitsverlauf auf (69). Es wurde gezeigt, dass hierbei auch die Tumormikroumgebung einen großen Einfluss auf die Resistenz der Lymphom-Zellen hat (68).

Durch Anwendung des BTK-Inhibitors CC-292 an MCL-Zelllinien konnte bereits eine Hemmung der Proliferation erreicht werden. Dennoch waren die beobachteten Effekte limitiert und unterschieden sich enorm zwischen den einzelnen MCL-Zelllinien. Ein möglicher Mechanismus, der wohl zu verminderten Sensitivität des Therapeutikums beiträgt sind aktivierende Mutationen in Genen des NF κ B -Signalwegs (70). Ein genaueres Verständnis der Vorgänge bezüglich der Sensitivität des MCL gegenüber CC-292 sind aber Großteils unbekannt und benötigen weiterer Erforschung. Im Hinblick auf die bekannten Interaktionen zwischen den MCL-Zellen und ihrer Tumormikroumgebung, die u.a. Ibrutinib Resistenz vermitteln, stellt auch der Aspekt der Tumormikroumgebung einen wichtigen Teil in der Erforschung der CC-292 Resistenz dar (64, 71). Deshalb wird im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der Tumor-Zell-Interaktion mit seiner Mikroumgebung bezüglich der Sensitivität gegenüber dem BTK-Inhibitor CC-292 untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften
Granta 519	Humane Mantelzell-Lymphom Zelllinie aus dem peripheren Blut einer 58-jährigen Kaukasierin; R/R, Stage 4 HHV-4 pos., t(11;14)(q13;q32), Cyclin D1 Überexpression und p15/p16 Deletion
HS-5	Humane Stroma-Zelllinie des Knochenmarks eines 30-jährigen Kaukasiers HPV-16 E6/E7 transformiert, adhärent Expriimierte Gene G-CSF, GM-CSF, KL, IL, LIF
JeKo-1	Humane großzellige Mantelzell-Lymphom Zelllinie aus dem peripheren Blut einer 78-jährigen Cyclin D1, Bcl-2, c-Myc und Rb - Überexpression CD3-, CD5+, CD10+, CD19+
Mino	Humane Mantelzell-Lymphom Zelllinie aus peripherem Blut eines 64-jährigen Kaukasiers P53, p16, p21 Onkogene
Z-138	Humane Mantelzell-Lymphom Zelllinie aus dem Knochenmark eines 70-jährigen männlichen Kaukasiers t(11;14)(q13;q32) CD3-, CD5-, CD10-, CD19+, CD20+, CD23+, FMC7-

3.1.2 Zellkultur

Reagenzien	Hersteller
Cell Proliferation Reagent (WST-1)	Roche, Mannheim, Deutschland
DMEM	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Dimethylsulfoxide (DMSO)	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
RPMI 1640 +L-Glutamin 2,0g/l NaHCO ₃	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Trypsin/EDTA 0,5%/0,02% in PBS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

Vi-Cell Reagent Pak	Beckmann Coulter, Brea, California, USA
Vi-Cell Sample Vial	Beckmann Coulter, Brea, California, USA
Zubehör/Instrumente	Hersteller
Cryo 1°C Freezing Container	Nalge Nunc International Corporation, Rochester, New York, USA
CryoTubes	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Eppendorf Tubes 0,5/2ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon 50/15ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Glaspipetten Costar Stripette 1/2/5/10ml	Corning Inc., Corning, New York, USA
Glaspipette Cellstar 25ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Multipipettenspitzen Combitips advanced 0,5/1/5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reservoirs Solution Basin	Heathrow Scientific Global Headquarters, Vernon Hills, Illinois, USA
TC-Flaschen: T75/T175 Standard & T25/T75/T175 Suspension	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
TC-Platten: 6 Well Standard & 6/12/96 Well Suspension	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
12 Well ahhängent	Corning Incorporated, New York, USA
Transwell Permeable Supports, 12Well (Membrane: d=12mm/0,4 µm)	Corning Incorporated, New York, USA

3.1.3 Inhibitoren

Name	Hersteller
CC-292/ AVL-292/ Spebrutinib	Selleckchem, Houston, Texas, USA
MK-2206 2HCl	Selleckchem, Houston, Texas, USA

3.1.4 Software

Software	Hersteller
Citavi6	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz

FlowJo 7.6.5	FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA
Fusion Capt Advance SL4	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
GraphPad Prism 6.01	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
ImageJ	Wayne Rasband, Open Source
Irfan View	Irfan Skiljan, Wiener Neustadt, Österreich
Microsoft Office (Excel, Word, Powerpoint)	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
ViCell Software	Beckmann Coulter, Brea, California, USA

3.1.5 Durchflusszytometrie

Material	Hersteller
7-AAD	BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Anti-Fibroblast-APC human	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Falcon Polystyren Round-Bottom Tube	Corning Inc., Corning, New York, USA
Falcon Polystyren Round-Bottom Tube with Cell-Strainer Cap	Corning Inc., Corning, New York, USA

3.1.6 MACS

Material	Hersteller
Anti-Fibroblast MicroBeads human	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
EDTA Solution pH8,0(0,5M)	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
LS Columns	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS-Puffer	Eigene Herstellung, siehe 3.1.10
Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells	ThermoFisher Scientific, Braunschweig, Deutschland

3.1.7 Western Blot

Reagenzien	Hersteller
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Ammoniumpersulfate (APS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
APS 10%	Eigene Herstellung, siehe 3.1.10
Complete Lysis-M EDTA-free	Roche, Mannheim, Deutschland
cOmplete Tablets, Mini EDTA free Easy pack	Roche, Mannheim, Deutschland
ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz	GE Healthcare, Amersham, Freiburg, Deutschland
Elektrophorese Puffer(10x)	Apotheke Kl. D. Univ. München, Deutschland
Elektrophorese Puffer	Eigene Herstellung, siehe 3.1.10
Ethanol 70%	Apotheke Kl. D. Univ. München, Deutschland
GelTransfer Puffer Tris 250mmol	Apotheke Kl. D. Univ. München, Deutschland
G-Met	Eigene Herstellung, siehe 3.1.10
Hydrogen peroxide solution H2O2	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
LDS Sample Buffer (4x)	Novex, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NNNN-Tetramethylethylenediamine	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 & 3	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Pre-Diluted Protein Assay Standards: BSA Set	ThermoFisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
ProteinMarker V	peqlab, Erlangen, Deutschland
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
SA	Eigene Herstellung, siehe 3.1.10
Sample Reducing Agent (10x)	Novex, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
SB	Eigene Herstellung, siehe 3.1.10
SDS 10%	Eigene Herstellung, siehe 3.1.10
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
TBS Puffer pH8,0(10x)	Apotheke Kl. D. Univ. München, Deutschland
TBST	Eigene Herstellung, siehe 3.1.10
Tris pH 6,8/ 8,8	Eigene Herstellung, siehe 3.1.10

Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zubehör	
Filterpapier 30x60cm Gel Blot Paper	GE Healthcare, Amersham Hybond-P, Freiburg, Deutschland
Gel-Kassetten 1mm und Kämmen (10/12/15er)	Novex, life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
PVDF Blotting Membrane 0,45µm 300mmx4mm	GE Healthcare, Amersham Hybond-P, Freiburg, Deutschland

3.1.8 Transfektion

Material	Hersteller
Ingenio Electroporation Solution	Mirus Bio LLC, Madison, Wisconsin, USA
Ingenio Küvetten	Mirus Bio LLC, Madison, Wisconsin, USA
Pasteurpipetten Feinspitz Mini steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
siRNA-AKT OnTarget plus Smart	Dharmacon Inc., Lafayette, Colorado, USA
siRNA-C AllStars Negative Control siRNA (5 mmol)	Quiagen N.V., Venlo, Niederlande

3.1.9 Antikörper

Name	Molekulargewicht	Hersteller	Quelle	Verdünnung	Nr.
Akt	60kDa	Cell Signaling	rabbit	1:500	9272
BIM	12, 15, 23kDa	Cell Signaling	rabbit	1:500	2933
FOXO1	78 – 82kDa	Cell Signaling	rabbit	1:500	2880 S
GAPDH	37kDa	Santa Cruz	mouse	1:5000	
Lamin B1	68, 25kDa	Cell Signaling	rabbit	1:500	12586
phAKT Ser473	60kDa	Cell Signaling	rabbit	1:500	4058 S/L
phBTK Tyr223	77kDa	Cell Signaling	rabbit	1:500	5082 P/S
phFOXO1	82kDa	Cell Signaling	rabbit	1:500	9461 S

Hersteller: Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA

Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, Texas, USA

3.1.10 Selbsthergestellte Reagenzien und Puffer

Reagenz	Zusammensetzung
Albumin 5%	5g Albumin Fraktion V 100ml TBST Spatelspitze Natriumazid
Aqua bidest (Millipore)	Zweifach destilliertes Wasser
APS 10%	1g Ammoniumpersulfat 10ml H ² O
Elektrophorese Puffer	4,5ml Aqua bidest 500ml Elektrophorese Puffer 10x
G-NET	1,25g Gelatine 50ml NET 10x 450ml Aqua bidest
MACS-Puffer	500ml PBS 2,5g Albumin 2ml EDTA 0,5M Sterile Filtration
Milk 5%	5mg Milchpulver 100ml TBST-Puffer
NET 10x	438,30g NaCl 93,60g EDTA-2Na-2H ₂ O (Titriplex III) 302,85g Tris 25,0g Tritin X-100 zu 5l mit H ² O aufgefüllt
SA	100mg Luminol 26,67ml 1,5M Tris ph 8,6
SB [lichtgeschützt]	44mg para-Hydr.Couramin Acid 40ml DMSO
SDS 10%	10g SDS auf 100ml H ² O
Selfmade ECL	3ml SA 300µl SB 0,9µl H ² O ²

TBST-Puffer	900ml Aqua bidest 100ml TBS-Puffer 1ml Tween 20
Tris -HCL 1,5M ph 6,8/ 8,8	908,55g Tris Zu 5l mit H ² O aufgefüllt pH mit HCL eingestellt

3.1.11 Geräte

Gerät	Hersteller
CO ² -Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Sicherheitswerkbank Berner FlowSafe B-[MaxPro] ² -130	Berner International GmbH, Elmshorn, Deutschland
Vi-Cell XR	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Heizblock Thermostat BT 1302	DITABIS AG, Pforzheim, Deutschland
Kreisschüttler KS 260 Basic	Ika-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Labor-Kühlschrank	Tritec, Hannover, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mikroskop AE2000	MoticEurope, Barcelona, Spanien
Mikrozentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multischüttler Unitwist 3D	UniEquip GmbH, Planegg, Deutschland
Präzisionswaage PCB	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Rollenmischer RS-TR 5	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc. Bohemia, New York, USA
Zentrifuge Heraeus Megafuge 40R	Scientific Industries Inc. Bohemia, New York, USA
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Handpipetten Pipetman 1000/200/20/2µl	Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Multipipette M4	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Transferpette S8 (30-300µl)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Elektrophoresekammer XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fusion SL	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
GloMaxDiscover	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Power Pac 3000	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Power Pac Adaptor	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, California, USA
BD FACS Canto II	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
MACS MultiStand	Milteny Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MidiMACS Separator	Milteny Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nukleofector 2b	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 MCL-Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) erworben und fortwährend bei -80°C in DMSO aufbewahrt. Für die Zellkultur wurden alle 3 Monate neue Zellen, aus einer Stammkultur, aufgetaut, welche jährlich genetisch, mittels PCR und Sequenzierung, auf ihre Reinheit und Authentizität untersucht wurde. Ebenso erfolgten regelmäßig Mykoplasmentests um eine Kontamination auszuschließen. Die Zellen wurden in 20% RPMI, welches mit 10% FBS versetzt war, in Suspensions-Kulturflaschen kultiviert und im Inkubator bei konstanten 37°C , 5% CO_2 und 95% relativer Luftfeuchtigkeit aufbewahrt. Alle 2(3) Tage wurden die Zellzahlen mittels ViCell®-Messung durch elektronische Zellzählung ermittelt und die Zellen auf folgende Dichten reduziert: Granta 519 0,7(0,4); Mino 0,6(0,3); JeKo-1 0,4(0,2); Z-138 0,3(0,1) [$\times 10^6/\text{ml}$]. Dafür wurde die Zellsuspension von berechneter Menge in den Kulturflaschen belassen und mit Medium auf 10-12ml aufgefüllt. Jeden Monat wurden die kultivierten Zelllinien in neue Flaschen überführt.

3.2.1.2 Feederlayer-Zellen

Zusätzlich zu den MCL-Zelllinien wurden stromale Zelllinien verwendet, um die Tumormikroumgebung zu simulieren. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie handelt es sich um HS-5, eine aus humanen Fibroblasten des Knochenmarks bestehende Zelllinie, die ebenfalls vom DSMZ erworben wurde. Sie wurde mit DMEM und 10% FBS in adhärennten 20ml Flaschen, im Inkubator, bei gleichen Bedingungen wie die MCLs, kultiviert. Alle 2 bzw. 3 Tage wurden sie, nach Entfernen des Mediums, durch 5-minütige Inkubation bei 37°C mit 5ml 0,05% Trypsin abgelöst und mit 10ml Medium verdünnt. Anschließend konnte mittels ViCell-Messung die Zellzahl ermittelt werden. Für 2 Tage wurden 10×10^6 (für 3 Tage 5×10^6) Zellen in den Kulturflaschen belassen und mit Medium auf 20ml aufgefüllt. Auch die HS-5 Zellen wurden nach 1 Monat in Kultur in neue Flaschen überführt und alle 3 Monate neu aus der Stammkultur aufgetaut. Des Weiteren erfolgten ebenso regelmäßig Kontrollen mittels Mykoplasmentest und DNA-Analyse.

3.2.2 Zellansätze

Der erste Schritt jedes Experimentes bestand in der Herstellung eines geeigneten Zellkultur-Ansatzes. Die Versuche wurden in der Regel im Triplikat angesetzt, um Abweichungen durch Pipettierfehler zu erkennen und verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Für jedes Experiment wurde in identischer Zellkonzentration die Ko-Kultur (MCL und Feederlayer) und die jeweilige Monokultur angesetzt. Zu Beginn wurden die HS-5 Zellen gezählt und auf die benötigten Konzentrationen verdünnt. (6-Well: 4h=0,14/ über Nacht=0,1 50mlFL: 4h=0,26/über Nacht=0,2 [$\times 10^6$ Zellen/ml]) Anschließend erfolgte der Ansatz in Kulturgefäße für adhärennte Zellen und eine Inkubation von 4h bzw. über Nacht. Die Inkubationszeit dient den Fibroblasten zum Absetzen und zur Adhäsion am Well-/Flaschenboden. Nach erfolgreicher Inkubation wurden im zweiten Schritt die MCL-Zellen mit Medium (RPMI) verdünnt, um ihre gewünschte Dichte zu erreichen. (24/48h: JeKo-1=0,5/0,4 Z138=0,4/0,3 Mino=0,5/0,4 Granta=0,7/0,6

[x10⁶Zellen/ml]) Die MCL-Monokultur wurde in Wells oder Flaschen für Suspensionen ausgesät, die in ihrer Größe mit den adhärennten Behältnissen übereinstimmten. Um die Ko-Kultur herzustellen, wurde das Medium des Feederlayer-Ansatzes durch die vorbereitete MCL-Medium-Suspension ersetzt. Für HS-5 in Monokultur wurde vom bestehenden Ansatz einzig das Medium (anstelle von DMEM nun ebenfalls RPMI) ausgewechselt. Der letzte Schritt beinhaltete die Behandlung der Zellansätze. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Inhibitoren in, durch Dosisfindung festgelegten, konstanten Konzentrationen verwendet. (BTK-Inhibitor CC-292: 5µM / pAkt-Inhibitor MK-2206: 1µM) Die Inhibitoren wurden von Selleck®, als Pulver, bezogen und in DMSO gelöst (MK2206 auf 10mM & CC-292 auf 50mM). Anschließend wurden sie aliquotiert, bei -80°C aufbewahrt und für die Versuche aus dem identischen Stock aufgetaut. Im Kühlschrank waren die Inhibitoren 2 Wochen haltbar. Die benötigte Konzentration der Inhibitoren wurde durch Vorverdünnung in Medium erreicht. Die Inhibitorlösung wurde anschließend unter Abdunklung sorgfältig in die Wells/Flaschen pipettiert. Alle Vorverdünnungen wurden so gewählt, dass eine Mindestmenge von 4µl der Inhibitorlösung zu pipettieren war, um Ungenauigkeiten im Pipettieren möglichst gering zu halten. Alle Ansätze wurden sowohl mit als auch ohne Behandlung/Inhibitoren hergestellt, um die Kontroll-Probe mit den behandelten Proben (Einzel-, sowie Kombinations-Treatment) zu vergleichen.

Somit ist der Standard-Ansatz wie folgt übersichtlich darzustellen:

Tabelle 1: Zellkultur-Ansätze Übersicht

K	MK	CC	Kombi		K	MK	CC	Kombi		K	MK	CC	Kombi
K	MK	CC	Kombi		K	MK	CC	Kombi		K	MK	CC	Kombi
K	MK	CC	Kombi		K	MK	CC	Kombi		K	MK	CC	Kombi

MCL Monokultur

MCL + FL Ko-Kultur

FL Monokultur

Um bei der Ko-Kultur zwischen direktem Kontakt und indirekter Interaktion, beispielsweise durch Mediatoren, zu unterscheiden, wurde eine spezielle Form der Zellkulturansätze angewandt. Zusätzlich zu den regulären 12-Well-Platten wurden einsetzbare Polycarbonat Membranen mit 0,4µm Porengröße verwendet. Auch in den Membran-Wells wurde zuerst der Feederlayer am Well-Boden ausgesät. Nach 4h bzw. über Nacht wurde dann das Medium vorsichtig abgenommen und anschließend nur noch 1,5ml neues Medium (RPMI) auf die FL-Zellen gegeben. Anschließend wurden die Membranen in die Wells gesetzt und mit jeweils 0,5ml MCL-Medium-Suspension befüllt. Der Inhibitor wurde entsprechend dem Flüssigkeitsverhältnis zwischen Membran und Wellboden aufgeteilt.



Abbildung 4: Transwell

Die Zellzählung erfolgte analog zum Vorgehen wie in 3.2.3.1 beschrieben, wobei zu Beginn der Membranhalt vorsichtig gemischt, abpipettiert und gezählt und die Membran anschließend sofort entfernt wurde. Durch Kontrollzählung des ÜS wurde überprüft, dass keine MCL-Zellen durch die Membran diffundiert sind.

3.2.3 Zellbiologische Methoden

3.2.3.1 Zellzählung

Zur automatisierten Zellzählung wurde das ViCell®-System verwendet, wofür 500-600µl Zelllösung pro Messung benötigt wurden. Die Feederlayer Zellen aus der Monokultur wurden dazu vor der ViCell®-Messung mit Trypsin abgelöst. Hierfür erfolgte die komplette Entfernung des Überstandes. Bei der Zellzählung der Ko-Kultur wurde zuerst vorsichtig gemischt und anschließend der komplette Überstand in ein Falcon überführt. Hieraus wurde die Zellzahl, der im Überstand befindlichen MCL-Zellen, ermittelt. Anschließend wurden alle adhärenenten Zellen (MCL eingestet + FL) wiederum trypsiniert, inkubiert, gelöst, mit Medium gemischt und ebenfalls gezählt. Die Zugabe von Trypsin erfolgte jeweils in folgenden Mengen (*in ml*):

50ml Flasche	20ml Flasche	6-Well	12-Well
10	5	1	0,4

Tabelle 2: Menge des Mediums in ml

Das ViCell®-System liefert Werte für die lebenden Zellen[*10⁶/ml] und die Überlebensrate [Viability in %]. Hierfür wird einzig das Zytoplasma toter Zellen mit Trypanblau angefärbt, da die Zellmembran vitaler Zellen eine wirksame Barriere bildet. Anschließend werden Bilder erstellt aus denen jeweils alle lebendigen Zellen maschinell gezählt und gemittelt werden.

Die Zellzählungen im Rahmen dieser Arbeit wurden im Triplikat ausgeführt und daraus ein Mittelwert berechnet, um leichte Schwankungen in der ViCell®-Zählung auszugleichen.

3.2.3.2 WST-1 Assay

Der WST (Water Soluble Tetrazolium) -1 Assay dient dem Nachweis metabolisch aktiver Zellen durch photometrische Messung der enzymatischen Aktivität der Zellen anhand ihrer NADPH Bildung durch Glykolyse. In dieser Arbeit wurden WST-Assays zur Erstellung einer Dosisreihe mit verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen verwendet.

Die WST Assays wurden in 96-Well-Platten angesetzt. In alle randständigen Wells wurden zunächst je 200µl Medium verteilt. Hinzu kam eine Kontroll-Reihe mit jeweils 100µl/Well, die dem Messgerät als Kalibration diente. Weiterhin erfolgte die Herstellung der benötigten Verdünnungsreihe aus den Inhibitoren. Hiervon wurden dann jeweils 50µl der Inhibitor-Lösungen von niedrigster zur höchsten Konzentration in die Wells verteilt. Für die Kontrollreihe wurde 50µl reines Medium verwendet. Zum Schluss wurden die MCL-Zellen in gleicher Konzentration mit je 50µl auf alle Wells verteilt. Die Inkubation erfolgte für 48h im Brutschrank.

Für die Messung wurden zuerst je 10µl des WST-Reagenzes auf alle zu messenden Wells verteilt und die 96-Well-Platten mit Alufolie lichtundurchlässig verpackt. Die Inkubation erfolgte für 3 bzw. 4h, je nach Zelltyp, im Brutschrank. Im Anschluss erfolgte die

photometrische Messung der enzymatischen Aktivität der Zellen im GloMax[®]. Jede Platte wurde 3x gemessen um anschließend einen Mittelwert mit Standardabweichung zu berechnen und so die Streuung gering zu halten.

3.2.3.3 Durchflusszytometrie mit FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

Mittels Durchflusszytometrie erfolgte die Messung der Apoptoserate der Zellen. Hierfür wird das Peptid 7-AAD (7-Aminoactinomycin) als Marker genutzt. Denn 7-AAD kann nur bei apoptotischen Zellen die Zellmembran passieren und verändert dadurch die Fluoreszenzeigenschaften ihrer DNA. Daher werden spezifisch apoptotische Zellen markiert und können im FACS gesondert detektiert werden. Nach definierter Behandlungszeit wurden pro Ansatz $1-2 \times 10^6$ Zellen bei 300G für 5min bei RT zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurden die Proben mit 1ml FACS-Puffer gewaschen. Zu den Zellpellets wurden nun je 100µl FACS-Puffer hinzugefügt, wobei zu den HS5-enthaltenden Zellpellets zusätzlich 10µl „Anti-Fibroblast-APC[®]“ pipettiert wurden. „Anti-Fibroblast-APC[®]“ sind Antikörper, die sich gegen Fibroblasten, also im Rahmen dieser Arbeit gegen HS-5, richten. Dadurch werden die HS-5 Zellen markiert und können unabhängig von den MCL-Zellen detektiert werden. Nach 10-minütiger Inkubation im Kühlschrank bei Dunkelheit erfolgte eine erneute Zentrifugation. Der Überstand wurde abgekippt und 300µl FACS-Puffer sowie 5µl 7-AAD wurden hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Messung der apoptotischen Zellen am Gerät „FACS-Canto II[®]“.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mithilfe des Programms „FlowJo“[®]. Dies zeigt die detektierten Zellen in Histogrammen an. Anhand der Achsendarstellung sind die APC sowie 7AAD negativen und positiven Zellen voneinander zu unterscheiden. Des Weiteren können Gitter erstellt werden, um Zellfraktionen zu gruppieren und anschließend zu quantifizieren. Das bedeutet, dass lebendige und tote, sowie MCL und FL-Zellen getrennt dargestellt und auch gezählt werden können. Primär wurden, die Auswertung beeinträchtigende, tote Zellfragmente, durch ein Gitter aus der Darstellung ausgeschlossen. Da das Ziel die Bestimmung der Apoptoserate der MCL-Zellen war, wurden in mehreren Schritten APC-negative und 7-AAD positive Zellen in einer gemeinsamen Gruppe im Histogramm zusammengeführt. APC-negativ schließt das Vorhandensein von Fibroblasten in der Messung aus und 7-AAD positiv bestätigt, dass sich die Zellen in der Apoptose befinden. Das daraus ermittelte Ergebnis der Apoptoserate konnte anschließend in eine Excel Liste überführt werden.

3.2.3.4 MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)

Zur Analyse der Proteinexpression erfolgte in den ko-kultivierten Zellen die Trennung der eingesteten MCL-Zellen von den FL-Zellen mittels „Magnetic Activated Cell Sorting“ (MACS). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das MACS Miltenyi Biotech-System[®] verwendet. Hierbei wird eine definierte Zellfraktion mit magnetischen MicroBeads markiert, wodurch sie in der sich im Magneten befindlichen Säule verbleiben. Die unmarkierte zweite Zellfraktion hingegen läuft isoliert, als negative Fraktion, durch die Säule. Mithilfe eines Stempels kann anschließend die positive Fraktion aus der Säule gewonnen werden. Somit können mittels MACS die Zellfraktionen aufgetrennt werden.

Nach Abschluss der Behandlung wurden je 10×10^6 Zellen der bereits durch Trypsinierung gelösten Zellsuspension der ko-kultivierten MCL und FL-Zellen bei 300G und 4°C für 10min zentrifugiert. Jedes entstandene Zellpellet wurde in PBS gelöst und in ein 2ml Eppendorf-Tube überführt. Durch eine erneute Zentrifugation bei 300G und RT für 10min wurde der Waschvorgang durchgeführt. Im Anschluss wurde das gewaschene Zellpellet in 80µl MACS-Puffer gelöst. Nach Zugabe von 20µl „Anti-Fibroblast Micro Beads®“ erfolgte eine 30minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurde alles mit 1ml PBS gewaschen und erneut 10min bei 300g und RT zentrifugiert.

Zur Vorbereitung der MACS-Säulen wurden diese in einem MidiMacs®-Magneten befestigt und mit 3ml MACS-Puffer gewaschen.

Das entstandene Zellpellet wurde nun in 500µl MACS-Puffer gelöst. Diese Zelllösung wurde auf die MACS-Säulen pipettiert, wobei darauf geachtet werden musste, Luftblasen zu vermeiden. Nun tropfte die negative Fraktion, bestehend aus den MCL-Zellen, in ein im Eis stehendes Falcon. Im Anschluss wurde mit 3x3ml MACS-Puffer gespült, wobei 9,5ml MCL-MACS-Puffer-Lösung entstanden. Aus der Säule wurde dann mit 5ml MACS-Puffer und dem beigelegten Stempel die dort verbliebene positive Fraktion in ein weiteres Falcon gepresst. Diese entstandene Suspension enthielt nun die markierten FL-Zellen. Anschließend wurde von allen Proben die genaue Zellzahl im ViCell® gemessen, um anschließend Proteine herzustellen oder die Fraktionierung durchzuführen.



Abbildung 5: MACS-Aufbau

Um nachzuweisen, dass die MACS-Separation die MCL- und Feederlayerzellen vollständig trennt und die Western Blot Banden der eingenisteten MCL-Zelllinien nur die Proteinexpression der Lymphomzellen zeigen, wurden im Anschluss an den MACS Versuch ein Western Blot sowie eine Durchflusszytometrie [und ein Fluorescence activated cell sorting (FACS)] durchgeführt. Da BIM nur in den Feederlayerzellen exprimiert wird, würde eine Verunreinigung der negativen Ko-Kultur-Fraktion sofort durch Banden in SET sichtbar werden. Dies ist, wie in Abb. 6 zu sehen, nicht der Fall. Außerdem sind auch in der Durchflusszytometrie [im FACS] der negativen Fraktion so gut wie keine HS-5 Zellen zu detektieren (<2%) (vgl. Abb. 7). Somit konnte gezeigt werden, dass durch das MACS-Verfahren im Zuge dieser Arbeit eine sorgfältige Zelltrennung erreicht wurde.

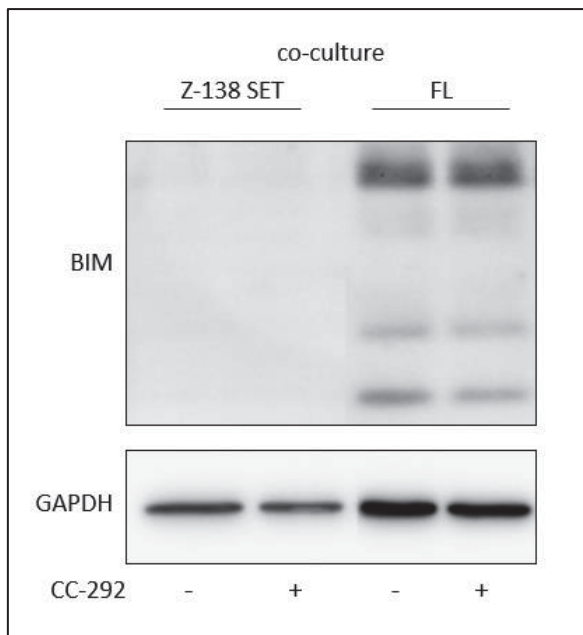


Abbildung 6: BIM Expression nach MACS zum Nachweis der MCL-Reinkultur

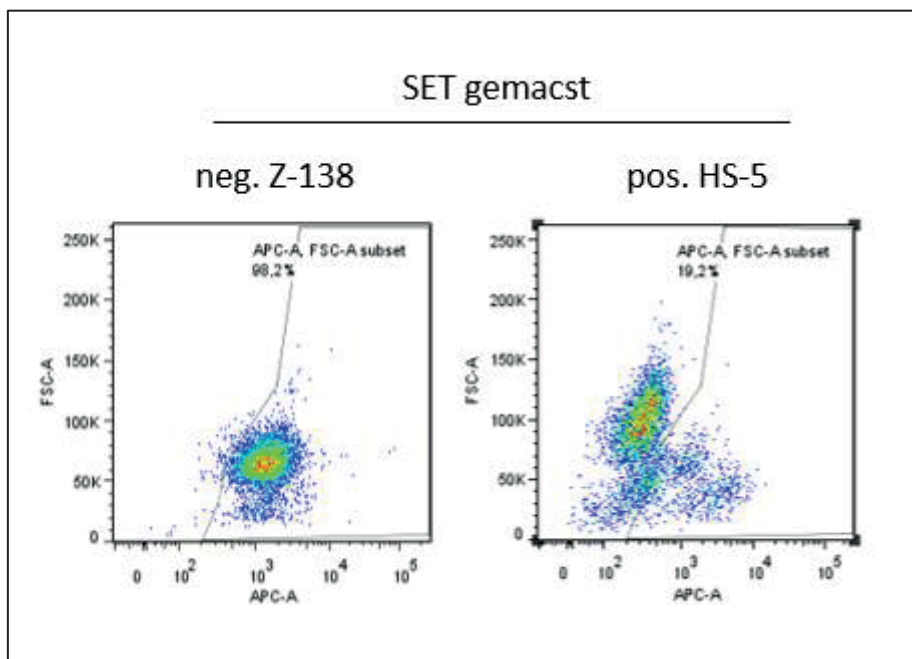


Abbildung 7: FACS nach MACS zum Nachweis der MCL-Reinkultur

3.2.3.5 Fraktionierung

Zur Trennung von zytoplasmatischen und nukleären Proteinfraktionen wurde das „Subcellular Protein Fractionation Kit®“ der Firma Thermo Scientific® verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach dem Protokoll „Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells®“ von Thermo Scientific® und wurden, um optimale Proteinqualität zu erhalten, auf Eis durchgeführt. Zu Beginn wurden die nach der MACS-Separation gewonnenen Zellen in 1ml PBS gewaschen und das entstandene Zellpellet anschließend in 200µl des Zytoplasma-Extraktions-Puffer (CEB (cytoplasmic extraction buffer)) gelöst. Nach Zugabe von 2µl eines Protease Inhibitors erfolgte die Inkubation bei 4°C auf einer Rüttelplatte für 10min. Nach 10-

minütiger Zentrifugation bei 5000G konnte die Zytoplasma-Fraktion, die nun im Überstand enthalten war, in ein beschriftetes Tube abpipettiert werden. Nach Waschen des verbliebenen Zellpellets mit PBS wurden 200µl Membran-Extraktions-Puffer (MEB (membrane extraction buffer)) und 2µl des Protease Inhibitors hinzugegeben und die Suspension für 5sek gemischt. Danach erfolgte die erneute Inkubation bei 4°C auf einer Rüttelplatte für 10min, bevor die Suspension bei 10000G für 10min zentrifugiert wurde. Der Überstand, der Membran-Proteine enthält, wurde abgenommen und das Zellpellet mit 100µl Kern-Extraktions-Puffer (NEB (nuclear extraction buffer)) und 1µl Protease Inhibitor durch 15-sekündiges Mischen gelöst. Die erneute Inkubation bei 4°C erfolgte für 30min und die Zentrifugation bei 12000G für 10min. Nun konnten gelöste Zellkern-Bestandteile mit dem Überstand abpipettiert werden. Zur Gewinnung der nukleären Proteinfraktion wurden bei RT 100µl NEB, 1µl Protease Inhibitoren mit 5µl CaCl₂ und 3µl Micrococcal Nuklease hinzugegeben und nach 15-sekündigen Mischen für 5min im 37°C Wasserbad inkubiert. Nach erneutem Mischen und 16000G Zentrifugation für 10min konnten abschließend die Chromatin-gebundenen Zellkernbestandteile mit dem Überstand extrahiert werden. Alle weiteren Schritte zur Analyse der Proteinexpression erfolgten analog dem Kapitel Western Blot.

3.2.3.6 Western Blot

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot. Hierbei werden Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Das zu untersuchende Protein kann mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert werden. Die relative Proteinmenge kann anhand der Bandenstärke densitometrisch quantifiziert werden.

3.2.3.6.1 Protein-Extraktion

Für die Proteinextraktion wurde nach definierter Versuchsdauer eine bestimmte Menge der Zellsuspension aus dem entsprechenden Versuchsansatz abgenommen und anschließend 10min bei RT (Raumtemperatur) und 2500G zentrifugiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach dem Protokoll „complete Lysis-M EDTA-free®“ und wurden zügig und auf Eis durchgeführt, um eine optimale Proteinqualität zu erhalten. Nach abgeschlossener Zentrifugation und Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen. Währenddessen erfolgte die Herstellung des Lyse-Reagenzes, aus Lysis-Puffer und den Phosphatase Inhibitoren 2 und 3 im Verhältnis je 1:100 (Inhibitor: Puffer). Anschließend wurde das Zellpellet in 100µl (JeKo-1, Mino, Granta 519) bzw. 80µl (Z-138) Lysis-Reagenz gelöst. Nach 10min Inkubationszeit auf einer Rüttelplatte bei 4°C wurde die Zell-Lysis-Lösung in der 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 14000G für 15min zentrifugiert. Der Überstand enthält die Proteine ohne Zellbestandteile und konnte bei Bedarf bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren werden.

3.2.3.6.2 Bradford Assay

Die genaue Erfassung der Proteinkonzentration erfolgt mit der Bradford Methode (72). Das Bradford-Reagenz wurde im Verhältnis 1:5 mit Aqua bidest hergestellt und in die Wells einer 96-Well Platte wurden je 200µl des Reagenzes vorgelegt. Mit BSA (0/ 0,625/ 1,25/ 2,5/ 3,75/ 5/ 7,5/ 10 µg/well) (0/ 0,125/ 0,25/ 0,5/ 0,75/ 1/ 1,5/ 2 mg/ml) wurde eine Standardreihe als Eichkurve erstellt und die Proteinproben mit je 5µl/Well hinzugefügt. Der beobachtete Farbumschlag wurde mit dem „GloMax Discovery®“ bei 595nm gemessen und anhand der BSA-Eichkurve die jeweilige Proteinkonzentration errechnet.

3.2.3.6.3 Herstellung der Elektrophorese-Gele

Zur Durchführung der Elektrophorese ist die Herstellung eines Trenn- und Sammelgels entsprechend untenstehender Zusammensetzung erforderlich.

SDS-Page Gele (Menge in ml für 2 Gele)

Zusammensetzung	Trenngel			Sammelgel
	8%	10%	12%	
Aqua bidest	6,9	5,9	4,9	3,4
Rotiphorese Gel 30	4,0	5,0	6,0	0,83
1,5M Tris (ph 8,8)	3,8	3,8	3,8	
1,5M Tris (ph 6,8)				0,63
10% SDS	0,15	0,15	0,15	0,05
10% APS	0,15	0,15	0,15	0,05
TEMED	0,009	0,006	0,006	0,005

Tabelle 3: Zusammensetzung der Elektrophorese-Gele

Zunächst wurde das Trenngel in die Gelkammer gegossen und mit 70% Isopropanol überschichtet. Nach 30min wurde das Isopropanol abgegossen, die Gelkammer 2-3x mit Aqua bidest gespült und mit Filterpapier getrocknet. Im Anschluss wurde das Sammelgel in die Kammer gegossen und ein Kamm zur Herstellung der Probenaschen eingesetzt.

3.2.3.6.4 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden die Protein-Proben entsprechend der Bradford-Proteinmengen-Messung mit Aqua bidest auf die gleiche Konzentration gebracht. Anschließend wurden „Loading Dye 4x“ und „Reducing Agent 10x“ als Probenpuffer hinzugegeben, um die Dichte der Proben zu erhöhen und sie zu reduzieren, und es erfolgte die Denaturierung für 10min im Heizblock bei 70°C. Währenddessen wurden die Gele, in die Elektrophorese-Kammern gespannt und die Kammern mit „Elektrophorese Runningpuffer“ zu 2/3 aufgefüllt. Anschließend wurden je 15-20µl der Proteinproben und 5µl des „Proteinmarkers V“ in die Taschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 61V für 30min, bei 81V für 1,5h und abschließend bei 121V.

3.2.3.6.5 Blotting

Für das Blotting wurden Membranen auf 7,5x8cm, sowie 12 Bögen Filterpapier der Größe 15x9cm zugeschnitten. Das Filterpapier wurde in Blot-Puffer gelegt und die Membranen zuerst in Methanol, Aqua bidest und anschließend ebenfalls in Blot-Puffer getaucht. Nach vorsichtigem Lösen der Gele aus den Kammern und Entfernung des Sammelgels wurden die Gele zwischen jeweils 3 Lagen Filterpapier auf eine Membran gelegt. Luftblasen mussten mithilfe eines Handdruck-Walzrollers entfernt werden. Anschließend wurde, nach Zugabe von Transferpuffer in die Blotkammer, der Blot für 2,5h bei 0,25A durchgeführt. Die Membranen

wurden anschließend noch für 1 h in 10ml 5%iger Milch geblockt, sowie 3x für 10min in TBST gewaschen.

3.2.3.6.6 Antikörperinkubation

Das zu untersuchende Protein kann mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert werden. Alle hierfür verwendeten primären Antikörper wurden 1/500 in 5% Albumin (Ausnahme: GAPDH 1/5000 in G-Net) verdünnt. Die sekundären Antikörper wurden 1/5000 in 5%iger Milch verdünnt. Die Membranen wurden zunächst über Nacht mit 2 ml der Antikörperlösung bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen 3x10min in TBST gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit 5ml der sekundären Antikörper-Lösung für 1h bei RT. An den sekundären Antikörper ist eine Peroxidase gekoppelt, die die Umsetzung von Luminol (Bestandteil des Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Detektionsreagenz) in seine oxidierte Form katalysiert, wodurch ein detektierbares Lichtsignal emittiert wird. Nach mehrmaligem Waschvorgang von 3x10min mit TBST zur Entfernung ungebundenen Antikörpers erfolgte nach Inkubation der Membran mit einem ECL-Detektionsreagenz die Darstellung der Proteinbanden sowie die Quantifikation des emittierten Signals im „Fusion SL®“. Anschließend wurden die Membranen erneut 3x10min mit TBST gewaschen und konnten somit zur Inkubation mit weiteren Antikörpern verwendet werden.

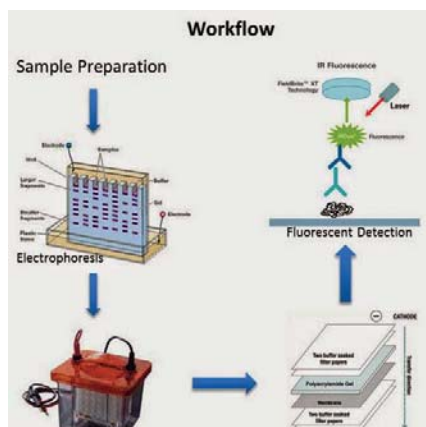


Abbildung 8: Western Blot

3.2.3.7 siRNA Transfektion mittels Nukleofektion

Um siRNA in Zellen zu transferieren, wurden die Zellen mit Nukleofektion transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde das Nukleofector Kit V® von Lonza® verwendet, das auf dem Verfahren der Elektroporation basiert. Hierfür wurde der Nucleofector™ 2b von Lonza® in der Programmeinstellung M-013 angewandt. Zur Gen-Inaktivierung von AKT diente die siRNA ON TARGET plus SMARTpool®. Die folgenden siRNA-Sequenzen wurden verwendet:

Gene	siRNA1	siRNA2	siRNA3	siRNA4
AKT1	CAUCACACCACCGACCAA	ACAAGGACGGGCACAUUAA	CAAGGGCACUUUCGGCAAG	UCACAGCCCUAAGUACUC

Tabelle 4: siRNA-Sequenzen

Als Kontrolle diente siRNA C All Stars Negative Control®. Zuerst wurde frisches Medium im 12-Well vorgelegt und erwärmt. Anschließend wurden 2×10^6 Zellen einer MCL-Zelllinie vorbereitet und gewaschen. Die Zellen wurden im Transfektionsgemisch [100µl Transfektionsreagenz, 2µl siRNA (in einer Konz. von 50µM)] gelöst und anschließend im Nukleofector elektroporiert. Dann wurde die Zell-Suspension ins Medium überführt und für 24h im CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend konnten die Zellen mit transfizierter siRNA für die Versuchsreihen angewendet werden. Durch Western Blots wurde die Effizienz der siRNA Transfektion nachgewiesen.

3.2.4 Statistische Analysen

Die gezeigten Daten sind repräsentativ für Experimente, die mindestens dreimal unabhängig voneinander mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt wurden. Die Viabilitäts-, Wachstums- und Apoptosestudien wurden unter Verwendung von je drei Wells oder Falcons pro Messwert (Triplets) durchgeführt und die Standardabweichung (standard deviation, SD) der Stichprobe ermittelt. Die Standardabweichung aller möglichen Stichprobenmittelwerte wurde durch den Standardfehler der Mittelwerte (standard error of the mean, SEM) beschrieben, berechnet durch SD/\sqrt{n} und als Fehlerbalken in den Diagrammen dargestellt. Alle statistischen Analysen wurden mittels der Software GraphPad Prism 6.01® durchgeführt. Signifikanz wurde mit dem paired t-Test (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001) untersucht.

4 Ergebnisse

4.1 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Die relevanten Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurden in unserer Arbeitsgruppe von Natalie Mack und Yvonne Zimmermann durchgeführt. Diese werden in Kapitel 4.1.1 und 4.1.2 beschrieben.

4.1.1 Sensitivität etablierter MCL-Zelllinien gegenüber der Therapie mit dem BTK-Inhibitor CC-292

BTK-Inhibitoren, wie beispielsweise Ibrutinib spielen bereits eine große Rolle in der Therapie der Lymphome und des MCL. Im Rahmen dieser Arbeit wurde CC-292 verwendet, weil es eine höhere Spezifität gegenüber BTK aufweist. Dies erlaubt eine zielgerichtetere, spezifisch den BTK Signalweg betreffende Analyse. Dadurch können neue Erkenntnisse über Mechanismen in der BTK-Inhibitor Therapie evaluiert werden, die zur Verbesserung im Therapieansprechen beitragen können. Zunächst wurde das Therapieansprechen der Mantelzell-Lymphom Zelllinien Granta 519, JeKo-1, Mino, Rec-1 und Z-138 gegenüber dem BTK-Inhibitor CC-292 untersucht. Die verschiedenen MCL-Zelllinien erwiesen sich als unterschiedlich sensibel gegenüber der Therapie mit CC-292. (Abb.9) Für die weiteren Analysen wurden Zelllinien mit durchschnittlicher Sensitivität gegenüber CC-292 ausgewählt (JeKo-1, Z-138).

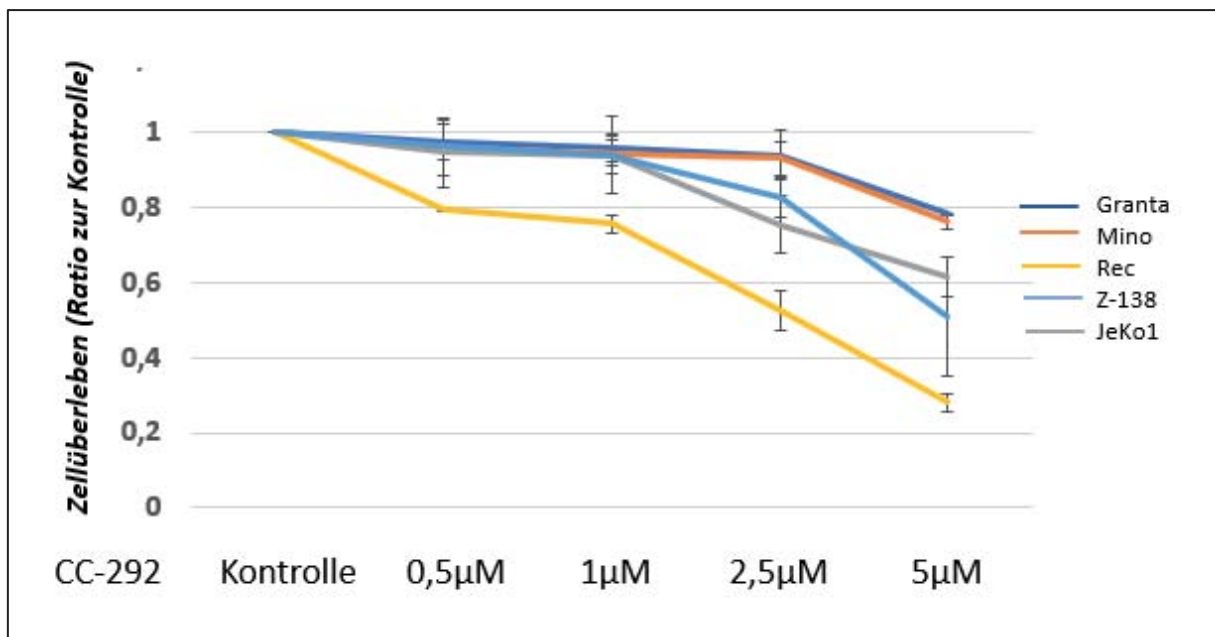


Abbildung 9: Therapieansprechen verschiedener MCL-Zelllinien auf CC-292

4.1.2 Einfluss der Tumormikroumgebung auf die MCL-Zellen

Die MCL-Zelllinien Z-138 und JeKo-1 wurden in Mono- sowie in Ko-Kultur mit dem humanen Feederlayer HS-5, wie unter 3.2.3.1 beschrieben, hinsichtlich Hemmung der Proliferation unter Therapie mit CC-292 mittels ViCell® Trypanblau-Messung untersucht. Dadurch sollte überprüft werden, inwieweit die Tumormikroumgebung, durch HS-5 simuliert, einen Einfluss auf die Proliferation der MCL-Zellen ausübt. Hierbei wurde unterschieden zwischen dem Effekt der HS-5-Zellen in direktem Zell-Zell-Kontakt mit den MCL-Zellen (SET) sowie den

kokultivierten Zellen ohne direkten Zell-Zell-Kontakt (SN). Wie in Abb. 9 dargestellt, zeigte sich durch die CC-292 Behandlung eine signifikante ($p=0,0061$ (Z-138)/ $p=0,0008$ (JeKo-1)) Zellzahl-Reduktion beider Zelllinien in Monokultur. Sie betrug 46% in JeKo-1 und 70% in Z-138. Diejenigen MCL-Zellen hingegen, die sich in Ko-Kultur mit HS5-Zellen befanden und sich in dem Feederlayer eingenistet hatten (SET), zeigten einen deutlich geringeren Proliferationsrückgang unter der BTK-Inhibitor-Behandlung (Z-138=6%/ JeKo-1=34%). In JeKo-1 Zellen konnte eine geringere Inhibition der Proliferation durch CC-292 auch in den MCL-Zellen beobachtet werden, die sich in der Ko-Kultur im Überstand befanden, dieser Effekt zeigte sich in Z-138 nicht. Die Interaktion mit Zellen der Tumormikroumgebung (HS-5) hemmt folglich das Ansprechen der MCL-Linien auf den BTK-Inhibitor signifikant. ($p=0,027$ (Z-138)/ $p=0,025$ (JeKo-1)) (Abb.10)

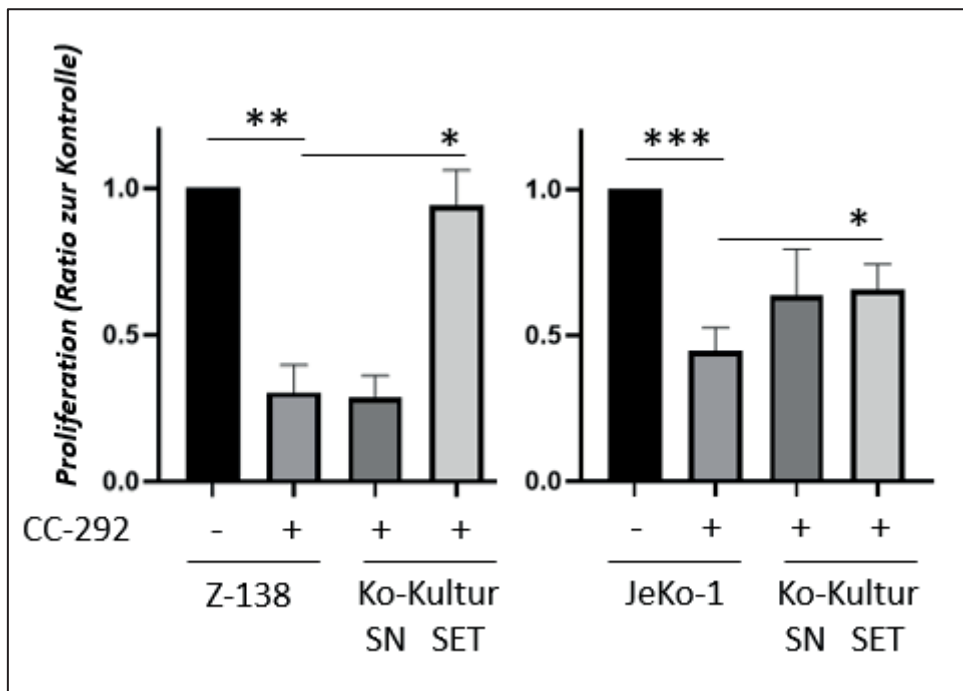


Abbildung 10: MCL in Mono- und Ko-Kultur auf HS-5 mit 5 μ M CC-292

Zusätzlich zur Proliferation wurde auch die Apoptose der MCL-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Für Z-138 konnte unter Behandlung mit 5 μ M CC-292 nach 48h eine Apoptose-Rate von 40% ermittelt werden. Die eingenisteten Zellen der Linie Z-138 (SET) zeigten hingegen nur noch eine Apoptose-Rate von 20%, wohingegen sich die Zellen aus dem Überstand der Ko-Kultur ähnlich verhielten wie die MCL-Zellen aus der Monokultur, was nahelegt, dass für den Schutz vor Apoptoseinduktion durch CC-292 direkter Zell-Zell-Kontakt mit den HS5-Zellen notwendig ist.

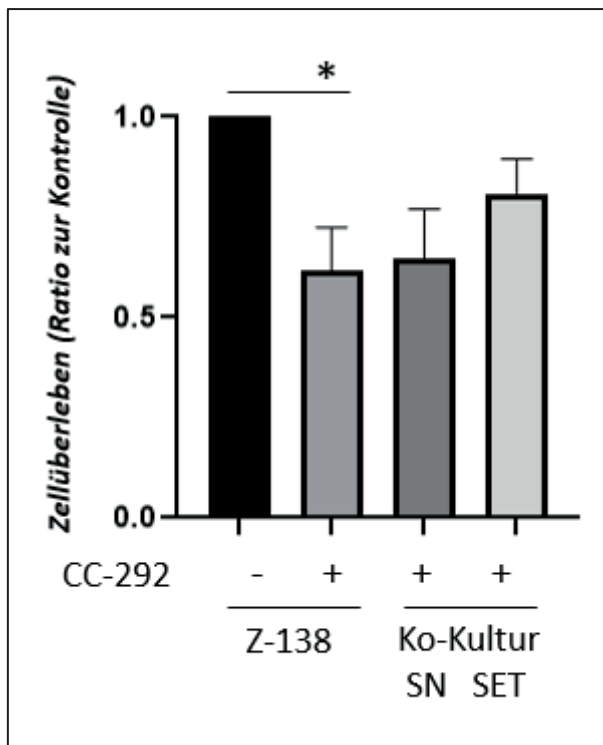


Abbildung 11: Z-138 in Mono- und in Ko-Kultur mit HS-5

Um zu evaluieren, welche molekularen Mechanismen für die verminderte Sensitivität gegenüber CC-292 durch die Interaktion mit Zellen der Tumormikroumgebung eine Rolle spielen, wurde zunächst die Expression von Proteinen aus verschiedenen Signalwegen untersucht, die an der Regulation des B-Zell-Rezeptorsignalwegs beteiligt sind. Hierzu wurden nach MACS Separation Western Blot Analysen wie in 3.2.3.6 beschrieben durchgeführt. Hierbei zeigte sich unter der Therapie mit CC-292 eine deutliche Suppression von phosphoryliertem (aktiviertem) BTK, was dem zu erwartenden Effekt durch die Behandlung mit CC-292 entspricht. Es zeigte sich hier jedoch kein Unterschied zwischen MCL-Zellen in Monokultur verglichen mit den Zellen der Ko-Kultur. Interessanterweise zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied in der Expression von pAKT. PhAKT ist die aktivierte Form der Proteinkinase B, einer Kinase des B-Zell-Rezeptor Signalwegs. Sie wird über PIP3 aktiviert und vermittelt über Downstream-Faktoren wie mTOR und FOXO gesteigerte Zellproliferation und Apoptosehemmung. Dadurch trägt sie als (Proto-)Onkogen zur Tumorphagenese bei (42). In den ko-kultivierten MCL-Zelllinien, die sich in den Feederlayer eingenistet hatten, stellte sich die pAKT Expression deutlich erhöht dar, im Vergleich zu Monokulturen und ko-kultivierten MCL-Zellen, die sich im Überstand (SN) ohne Zell-Zellkontakt zu den HS5-Zellen befanden.

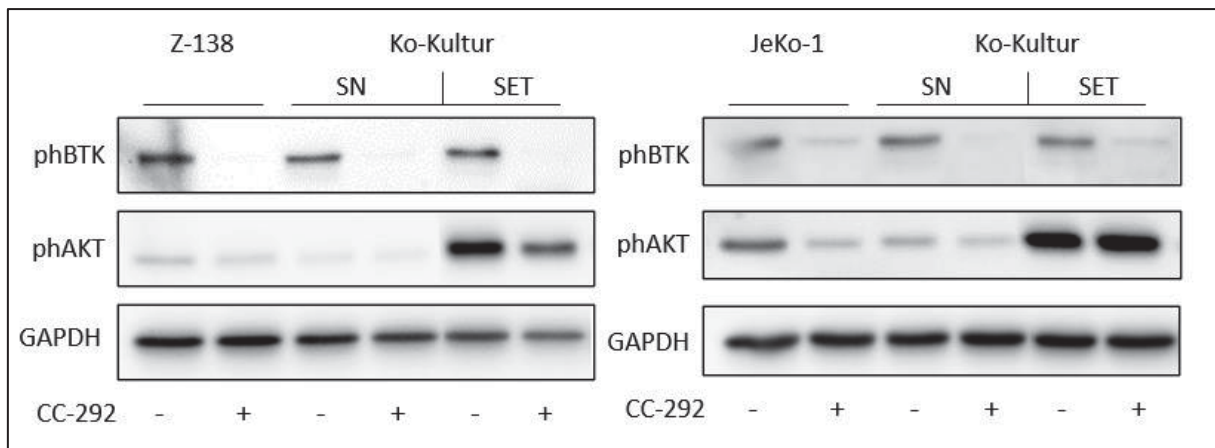


Abbildung 12: MCLs Z-138 und JeKo-1 in Mono- und Ko-Kultur auf HS-5 mit 5µM CC292

Aufgrund dieser Vorarbeiten wurden im Folgenden detailliert die Bedeutung von phAKT und seinen nachgeschalteten Signalwegen für den Einfluss der Tumormikroumgebung auf das Therapieansprechen gegenüber CC-292 analysiert. Des Weiteren wurden Möglichkeiten untersucht, wie der Schutz durch die Interaktion mit Zellen der Tumormikroumgebung überwunden werden kann.

4.2 Bedeutung der Zell-Zell-Interaktion für die Sensitivität gegenüber CC-292

Die Ergebnisse der Vorarbeiten legen nahe, dass für die Vermittlung der verminderten Sensitivität der MCL-Zellen durch Interaktion mit der Tumormikroumgebung ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen MCL-Zellen und Zellen der Tumormikroumgebung notwendig ist. Um dies zu überprüfen, wurde für die Ko-Kultur-Versuche ein Transwell-Insert mit 0,4µm Porengröße zwischen MCL-Zellen und FL eingesetzt. Da die Porengröße die MCL-Zellgröße unterschritt, konnten keinerlei MCL-Zellen durch das Insert diffundieren und das Insert verhinderte somit den direkten Kontakt zwischen den beiden Zellarten. 48h nach Inkubation mit 5µM CC-292 wurde die Proliferation erneut durch Trypanblau-Messung ermittelt. Abbildung 12 zeigt, dass sich die Proliferationsrate in der Insert-MCL-Ko-Kultur (Z-138=0,47; JeKo-1=0,51) kaum von den Zellen in Monokultur (Z-138=0,43; JeKo-1=0,52) bzw. auch nicht von den Zellen im Überstand (Z-138=0,44; JeKo-1=0,57) unterscheidet. Einzig die eingesteten MCLs zeigen eine deutlich erhöhte Proliferationsrate (Z-138=0,77; JeKo-1=0,80). Dadurch konnte der Schutzeffekt der Tumormikroumgebung, den die Vorversuche herausgearbeitet hatten, bestätigt werden. Weiterhin wurde deutlich, dass ein direkter Kontakt zwischen den MCL-Zelllinien und den stromalen Feederlayerzellen notwendig ist, um die Sensibilität gegenüber dem BTK-Inhibitor herabzusetzen.

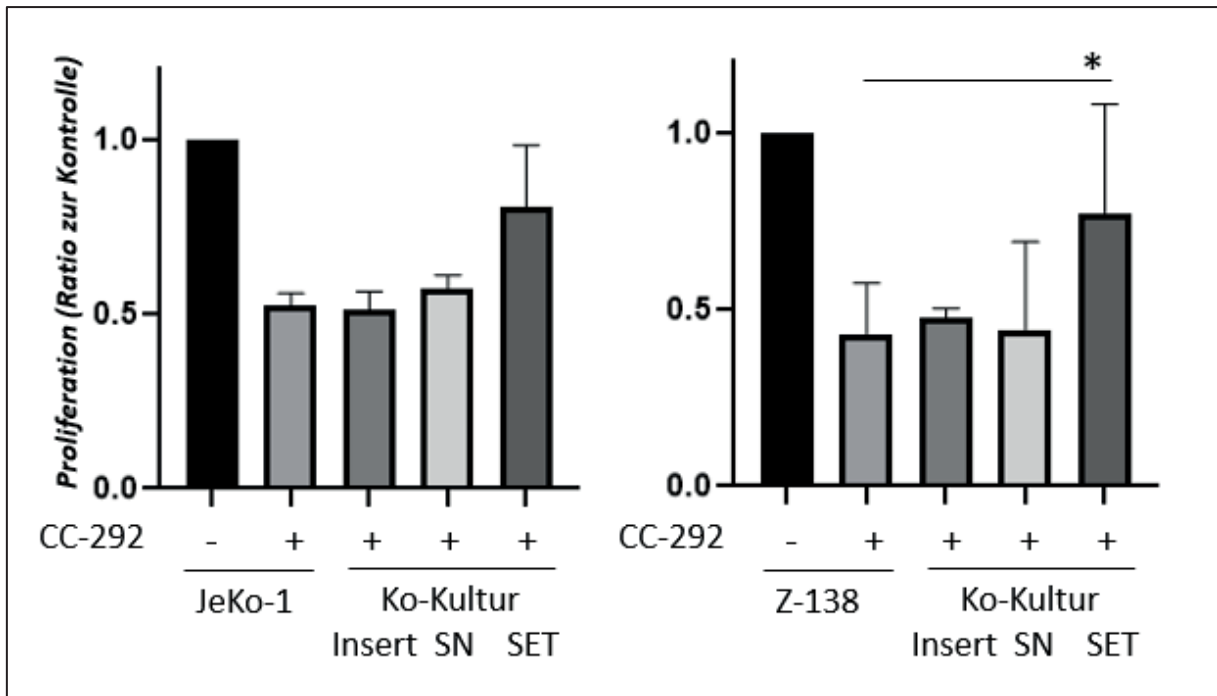


Abbildung 13: MCL mit 5 μ M CC-292 0,4 μ m Insert vs. direkter Zell-Zell-Kontakt

4.3 Evaluation der Expression von pAKT und seines Downstream-Targets FOXO1

Die gesteigerte Expression von pAKT in MCL-Zellen mit direktem Kontakt zu den Feederlayerzellen wurde zunächst mittels Western Blot bestätigt (Abb.14). Zur weiteren Analyse der Bedeutung von pAKT und seiner nachgeschalteten Signalwege für den Einfluss der Tumormikroumgebung auf das Therapieansprechen auf CC-292 wurde im nächsten Schritt die Expression von FOXO1 untersucht. FOXO1 ist ein Downstream-Target von AKT und hat als Transkriptionsfaktor pro-apoptotische Wirkung. FOXO1 wird durch aktiviertes AKT phosphoryliert. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Hemmung des Proteins. Das bedeutet, dass, bei einer Hemmung von FOXO1, vermehrt pFOXO1 vorliegt und die Apoptose vermindert abläuft. Bei der Analyse von pFOXO1 im Western Blot zeigte sich eine deutliche Zunahme der Expression in eingesteten MCL-Zellen (SET). (Abb.14)

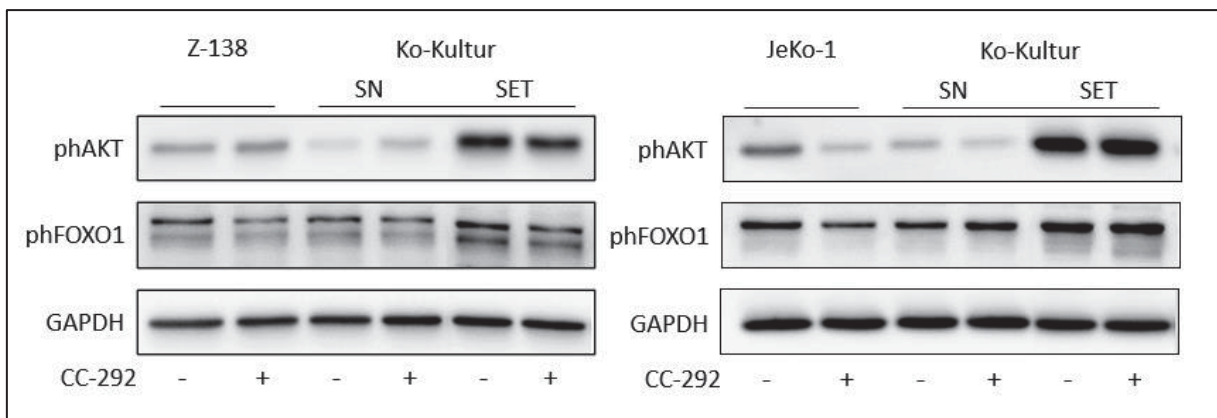


Abbildung 14: Z-138 und JeKo-1 Mono- und Ko-Kultur mit HS-5 24h nach CC-292 (5 μ M) Behandlung

Weitere Untersuchungen des Downstream-Targets FOXO1 deuten darauf hin, dass seine Inaktivierung durch Transport aus dem Zellkern induziert wird. Durch die Phosphorylierung über aktives AKT wird eine Translokation in das Zytoplasma induziert. Folglich werden FOXO-vermittelte Vorgänge, wie beispielsweise die Apoptose dadurch inhibiert. Um diesen Effekt im MCL zu überprüfen wurde eine Fraktionierung, wie in 3.2.3.5 beschrieben, durchgeführt. Dies dient zur Auftrennung der Proteinbestandteile nach ihrer Lokalisation. Somit können die Proteine, die sich im Kern befinden, von den im Zytoplasma befindlichen unterschieden werden.

Wie in Abb.15 dargestellt, zeigte sich hierbei eine verminderte Expression von FOXO1 im Nukleus in den eingesteten Zellen. Durch Quantifizierung mit dem Programm Image J wurden anschließend Werte ermittelt, um die Banden besser zu vergleichen. Dadurch ergab sich ein Rückgang der Expression im Nukleus (Sol) von rund 15%(Z-138) und 30%(JeKo-1), beim Vergleich der eingesteten MCL-Population (Ko-Kultur) gegenüber der Mono-Kultur.

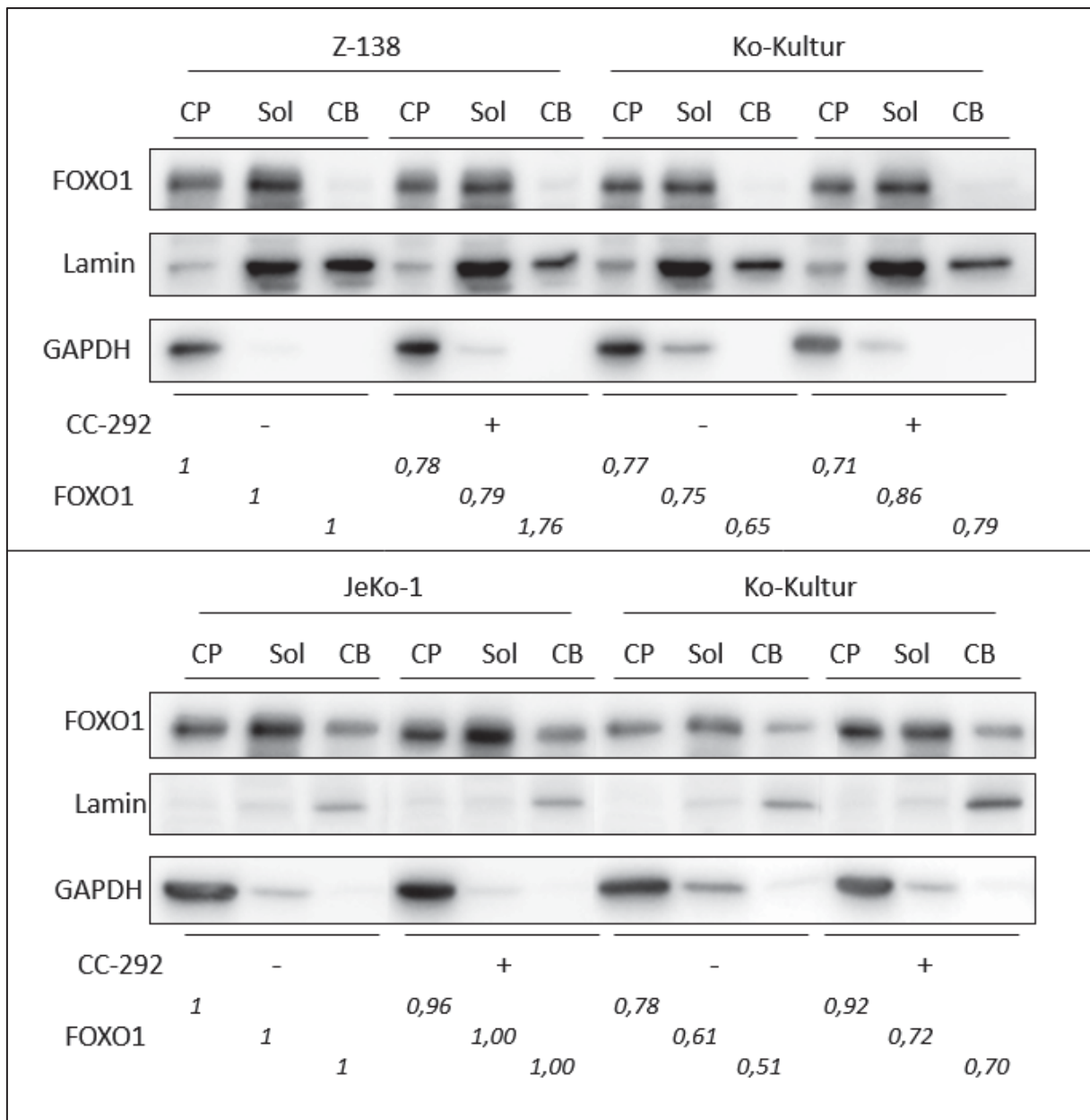


Abbildung 15: Z-138 und JeKo-1 in Mono- und Ko-Kultur auf HS-5

Parallel zur Proteinexpression wurde auch das Apoptoseverhalten der MCL-Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich in Ko-Kultur vermehrtes Zellüberleben unter CC-292 Behandlung, im Vergleich zur Monokultur. (vgl. Abb.16: Mono=0,678; SET=0,848/ p=0,0049)

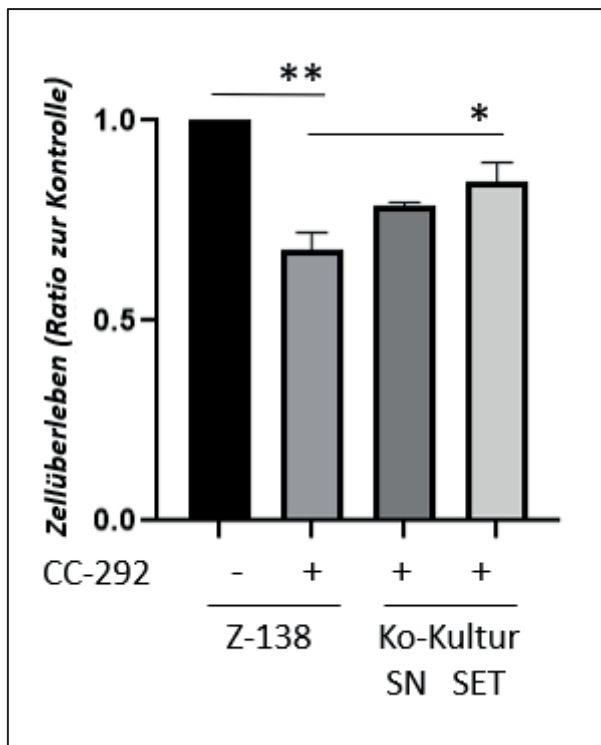


Abbildung 16: Z-138 in Mono- und Ko-Kultur auf HS-5

4.4 Abhängigkeit des Einflusses der Tumormikroumgebung auf die Sensitivität von MCL-Zelllinien gegenüber CC-292 von der Regulation der pAKT-Expression

Um zu überprüfen, ob die verminderte Sensitivität der Zelllinien gegenüber CC-292 direkt von der erhöhten Expression von pAKT in den ko-kultivierten, eingenisteten MCL-Zellen abhängt, wurde die Expression von AKT mittels siRNA gehemmt und die Sensitivität gegenüber CC-292 anhand der Proliferationsrate untersucht.

4.4.1 Etablierung eines geeigneten Transfektion-Verfahrens

Bevor mit der eigentlichen Versuchsreihe begonnen werden konnte, musste ein geeignetes Transfektionsverfahren etabliert werden. Hierzu wurden verschiedene Reagenzien der Firmen *Amaya* und *Ingenio* getestet. Wie in Abb.17 dargestellt wurde mit den Reagenzien von *Ingenio* eine bessere Hemmung der AKT Expression erzielt, weshalb für die weiteren Versuche dieses System verwendet wurde. Für die Nukleofektion wurde aus einer Auswahl geeigneter Programme die Einstellung „M-013“ etabliert.

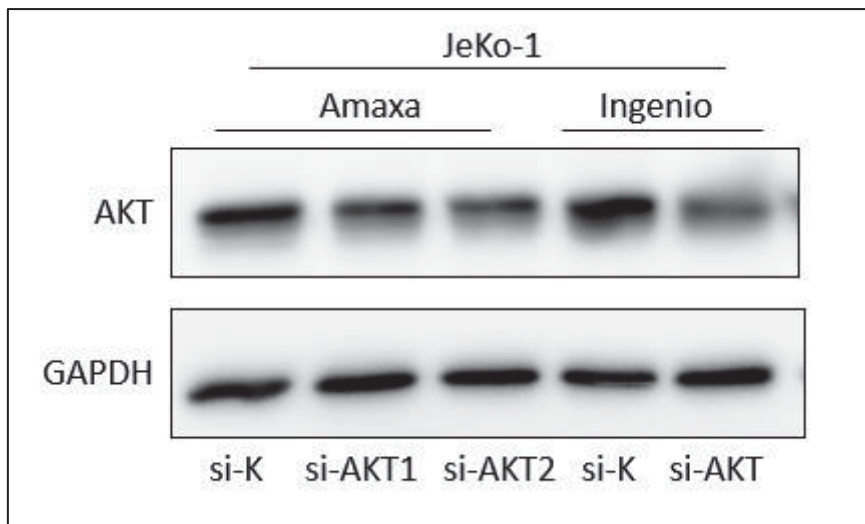


Abbildung 17: Proteinanalyse 48h nach Transfektion mit AKT-siRNA und Kontroll-siRNA; Vergleich der Reagenzien ‚Amaxa‘ und ‚Ingenio‘

4.4.2 Evaluation der Effektivität einer siRNA vermittelten AKT Inhibition

Um die Effektivität der siRNA vermittelten Inhibition von AKT in Abhängigkeit von der Zeit zu untersuchen, wurde die MCL Zelllinie JeKo-1 mit Kontroll- sowie AKT-siRNA transfiziert. Nach 24, 48 und 72h wurde die Proteinexpression von AKT und pAKT mittels Western Blot Analyse untersucht. Dabei zeigte sich der beste Effekt nach 72h mit einer Reduktion der AKT-Proteinexpression um 61% sowie der Expression des aktivierten pAKT-Proteins um 36%.

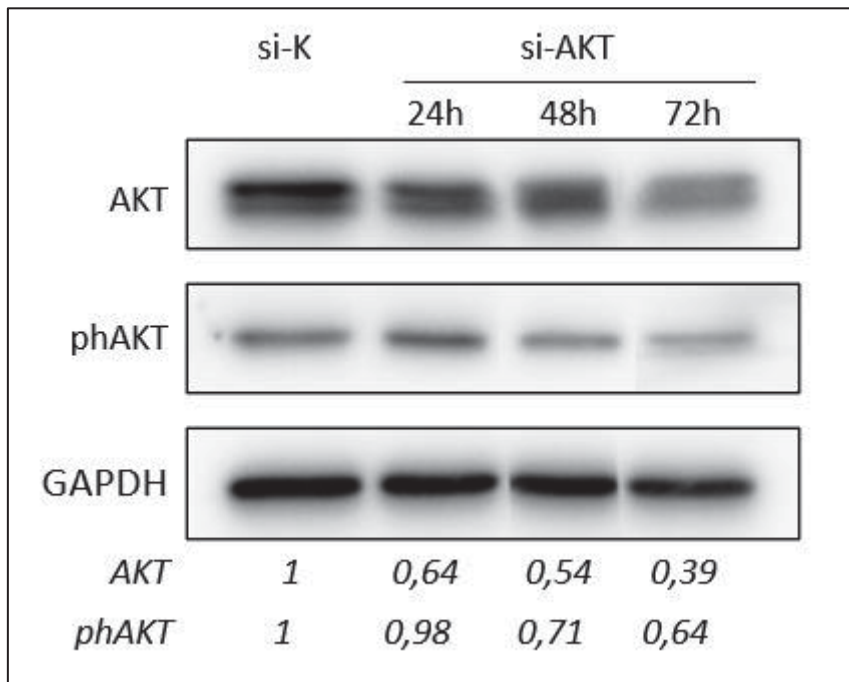


Abbildung 18: JeKo-1: Western Blot 24/48/72h nach si-Transfektion, Werte unterhalb: Quantifizierung der Intensität der Proteinexpression mit ImageJ in Relation zur Kontrolle

4.4.3 Hemmung der AKT-Überexpression in der MCL-Stromazell-Ko-Kultur durch siRNA

Um zu überprüfen, ob die verminderte Sensitivität der MCL-Zelllinie JeKo-1 gegenüber CC-292 direkt von der erhöhten Expression von pAKT in den ko-kultivierten, eingenisteten MCL-Zellen abhängt, wurde die Expression von AKT mittels siRNA gehemmt. 48h nach der Transfektion der Zellen mit AKT- bzw. Kontroll-siRNA erfolgte die Ko-Kultivierung der Zellen mit den HS5-Zellen und die Behandlung mit 5 μ M CC-292. Nach 24h der Behandlung, und somit 72h nach Transfektion, erfolgte die Ermittlung der Proliferationsraten. Zudem wurden die Zellfraktionen mittels MACS getrennt und die AKT/phAKT-Expressionen mittels Western Blot Analyse untersucht.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die mit AKT-siRNA transfizierten JeKo-1-Zellen, die sich in Ko-Kultur mit direktem Zell-Zell-Kontakt (eingenistet) befanden, im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten, in den Stromazellen eingenisteten MCL-Zellen eine signifikante Abnahme der Proliferationsrate unter CC-292 Behandlung aufwiesen (Abb.19).

Im parallel durchgeführten Western Blot zeigten die AKT-siRNA-transfizierten JeKo-1 Zellen eine geringere AKT-Expression als diejenigen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Dies zeigt, dass AKT durch siRNA effektiv gehemmt werden kann und wies die erfolgreiche Transfektion nach. In den Akt-si-RNA transfizierten MCL-Zellen in Monokultur sowie im Überstand (SN) wurde zudem eine Abnahme der pAKT-Expression sichtbar. Bei den Kontroll-siRNA-Proben war entsprechend den Ergebnissen mit JeKo-1 Zellen vorheriger Versuche [Vgl. 4.1.2 und Abb.12] beim Vergleich der eingenisteten Zellen (SET) zu Monokultur und Zellen im ÜS (SN) eine Zunahme der pAKT Expression zu beobachten. Beim Vergleich der eingenisteten Zelllinien (siRNA-K vs. siRNA-AKT) bezüglich ihrer pAKT Expression, zeigte sich jedoch nur ein geringer Rückgang in den Akt-siRNA-transfizierten im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten-Zellen.

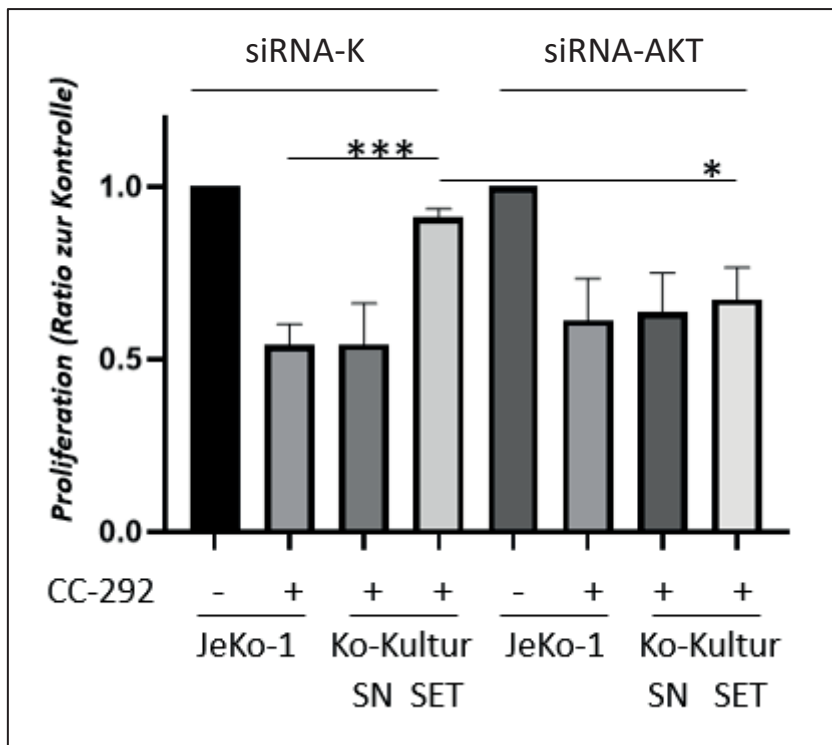


Abbildung 19: JeKo-1 Proliferation 72h nach si-Transfektion und 24-stündiger CC-292 Behandlung

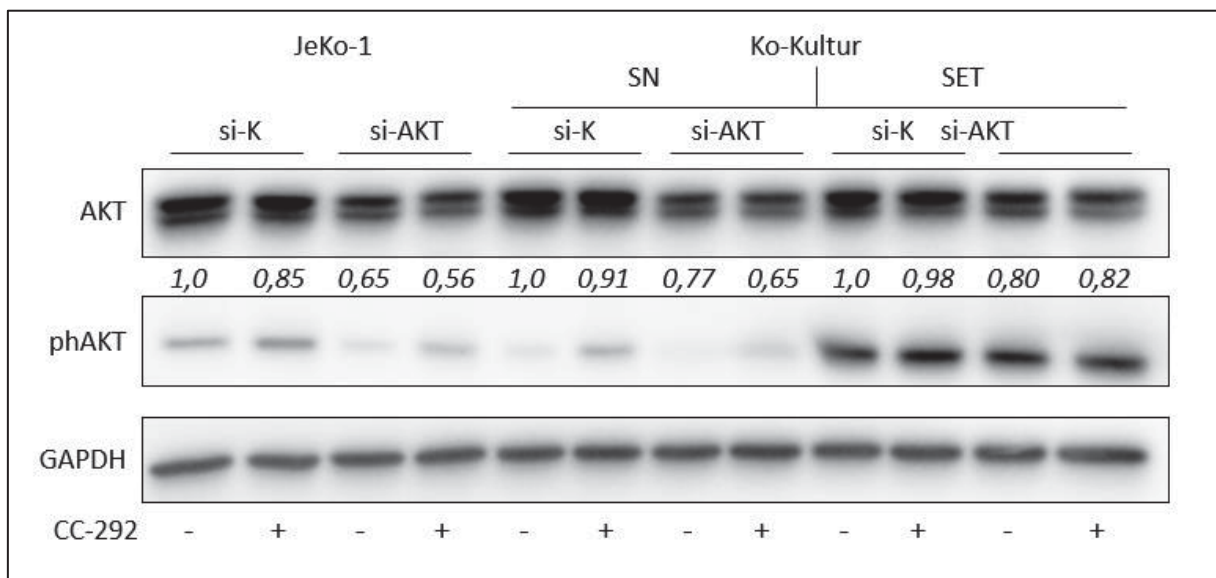


Abbildung 20: Western-Blot mit AKT und pAKT Proteinexpressionen

4.5 Kombination von CC-292 mit dem AKT Inhibitor MK-2206

Um die Hypothese zu stärken, dass die durch die Interaktion der MCL-Zellen mit der Tumormikroumgebung vermittelte Reduktion der Sensitivität gegenüber CC-292 von einer Überexpression von AKT abhängt, wurde untersucht, ob durch die pharmakologische Hemmung der AKT-Expression die Stromazell-induzierte CC-292 Resistenz im MCL überwunden werden kann. Hierzu erfolgte die Kombination von CC-292 mit dem AKT-Inhibitor MK-2206. Der panAKT-Inhibitor MK-2206 hemmt selektiv die Phosphorylierung aller AKT

Isoformen 1, 2 und 3 über Inhibition der Kinasen-Phosphorylierung sowohl am Serin als auch am Threonin Rest.

4.5.1 Wirkung von MK-2206 auf die pAKT Expression

Zunächst wurde die Wirkung von MK-2206 als Monotherapie im MCL hinsichtlich zytotoxischer Wirkung sowie Hemmung der pAKT Expression untersucht, um eine optimale Dosis für die Kombinationstherapie zu ermitteln. Hierzu wurden die MCL-Zellen JeKo-1 und Z-138 mit MK-2206 in unterschiedlichen Konzentrationen (0/ 1/ 2,5 und 5 μ M) behandelt. Nach 24h erfolgte die Analyse der Proliferationsrate (Abb.21) sowie der Proteinexpression mittels Western Blot (Abb.22). Hier zeigte sich eine effektive Hemmung der Proliferation von mindestens 20% (bei 1 μ M MK-2206: JeKo-1=0,6; Z-138=0,8), sowie eine komplette Hemmung der pAKT Expression unter 1 μ M MK-2206. Die Expression von unphosphoryliertem AKT blieb jeweils unverändert.

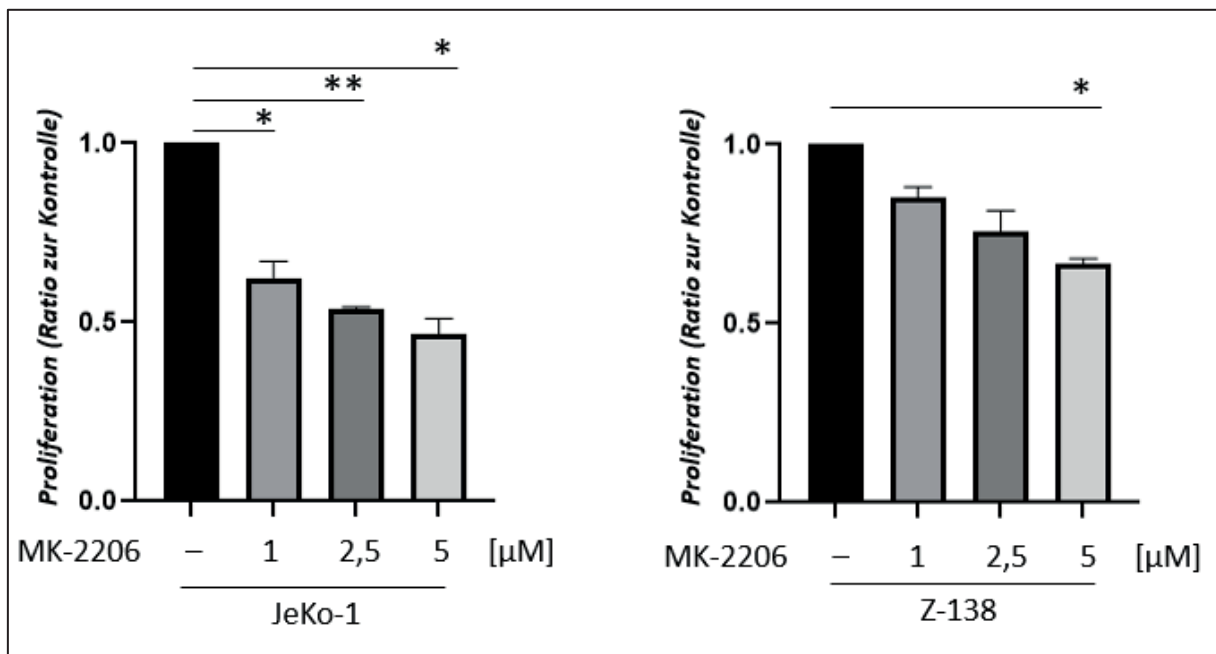


Abbildung 21: Proliferation JeKo-1 und Z-138 nach Behandlung mit unterschiedlichen Konz. MK-2206

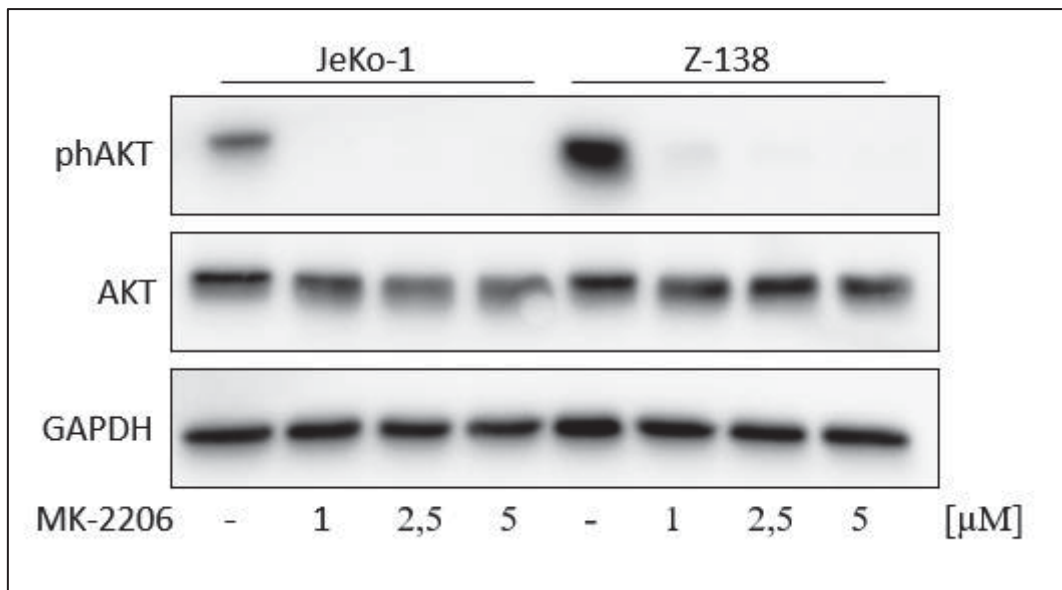


Abbildung 22: Dosisfindung MK-2206, 24h nach MK-2206-Behandlung unterschiedlicher Konzentrationen

Nach Ermittlung einer geeigneten Dosis erfolgte die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der MK-2206 Wirkung. Hierfür wurden die Zelllinien JeKo-1 und Z-138 mit 1μ M MK-2206 behandelt und nach 2, 6 und 24h jeweils Proteine hergestellt, aus denen erneut die Protein-Expressionen ermittelt wurden. Nach 2h zeigte sich bereits eine komplette Inhibition der phAKT Expression, was auch im 24h Verlauf anhält. Erneut blieb die Expression von unphosphoryliertem AKT jeweils unverändert.

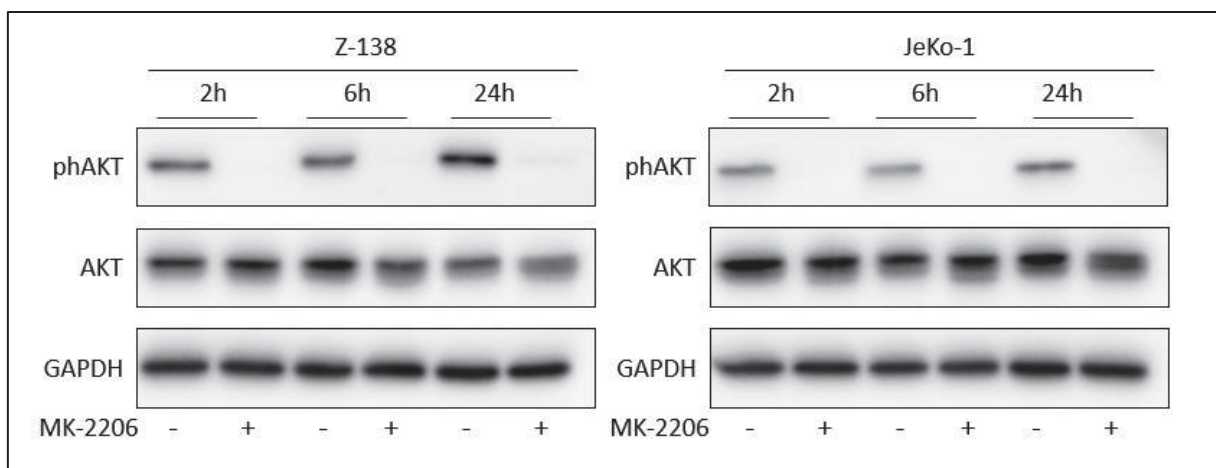


Abbildung 23: Zeitreihe mit 1μ M MK-2206 und phAKT und AKT Proteinexpression 2, 6 und 24h nach Behandlung

Aufgrund dieser Ergebnisse wird deutlich, dass der AKT-Inhibitor MK-2206 bereits nach kurzer Inkubationszeit eine suffiziente Hemmung der phAKT Expression im MCL bewirkt und zu einer effektiven Hemmung der Zellproliferation führt. Da das Hinzuziehen von MK-2206 vor allem zur Hemmung von AKT dienen soll, entschieden wir uns für die folgenden Versuche eine Konzentration von 1μ M MK-2206 für 24h anzuwenden.

4.5.2 Effektivität der kombinierten BTK & AKT-Inhibitor Therapie zur Überwindung der Stromazell-induzierten CC-292 Resistenz im MCL

Die bisherigen Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass eine vermehrte AKT Aktivierung durch die Interaktion von MCL-Zellen mit Stromazellen der Tumormikroumgebung die Sensitivität gegenüber CC-292 signifikant vermindert. Es wurde deshalb die Effektivität der kombinierten BTK & AKT-Inhibitor Therapie zur Überwindung der Stromazell-induzierten CC-292 Resistenz im MCL untersucht.

Die MCL-Zelllinien JeKo-1 und Z-138 wurden hierzu in Monokultur sowie in Ko-Kultur mit den HS5-Stromazellen jeweils mit 5 μ M CC-292 bzw. 1 μ M MK-2206 allein oder in Kombination der beiden Inhibitoren behandelt. Nach 24h Inkubationszeit wurden Proteine hergestellt und nach 48h die Proliferationsraten mittels ViCell Assay[®] ermittelt. Aus den Proteinlysaten wurde anschließend die pAKT Expression im Western Blot analysiert.

Abb. 24 zeigt, dass die Behandlung mit MK-2206 die ausgeprägte AKT-Überaktivität in den ko-kultivierten, engenisteten MCL-Zellen (sowohl in JeKo-1 als auch in Z-138) deutlich unterdrückt. Dieser Effekt wird auf funktioneller Ebene dadurch begleitet, dass die Kombination von CC-292 mit dem AKT-Inhibitor MK-2206 in den ko-kultivierten, engenisteten MCL-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsrate (Z-138=0,49/ JeKo-1=0,43) im Vergleich zu der Therapie mit CC-292 allein führt (Z-138=0,65/ JeKo-1= 0,60). Die kombinierte BTK & AKT-Inhibitor Therapie stellt folglich eine vielversprechende Möglichkeit zur Überwindung der Stromazell-induzierten CC-292 Resistenz im MCL dar.

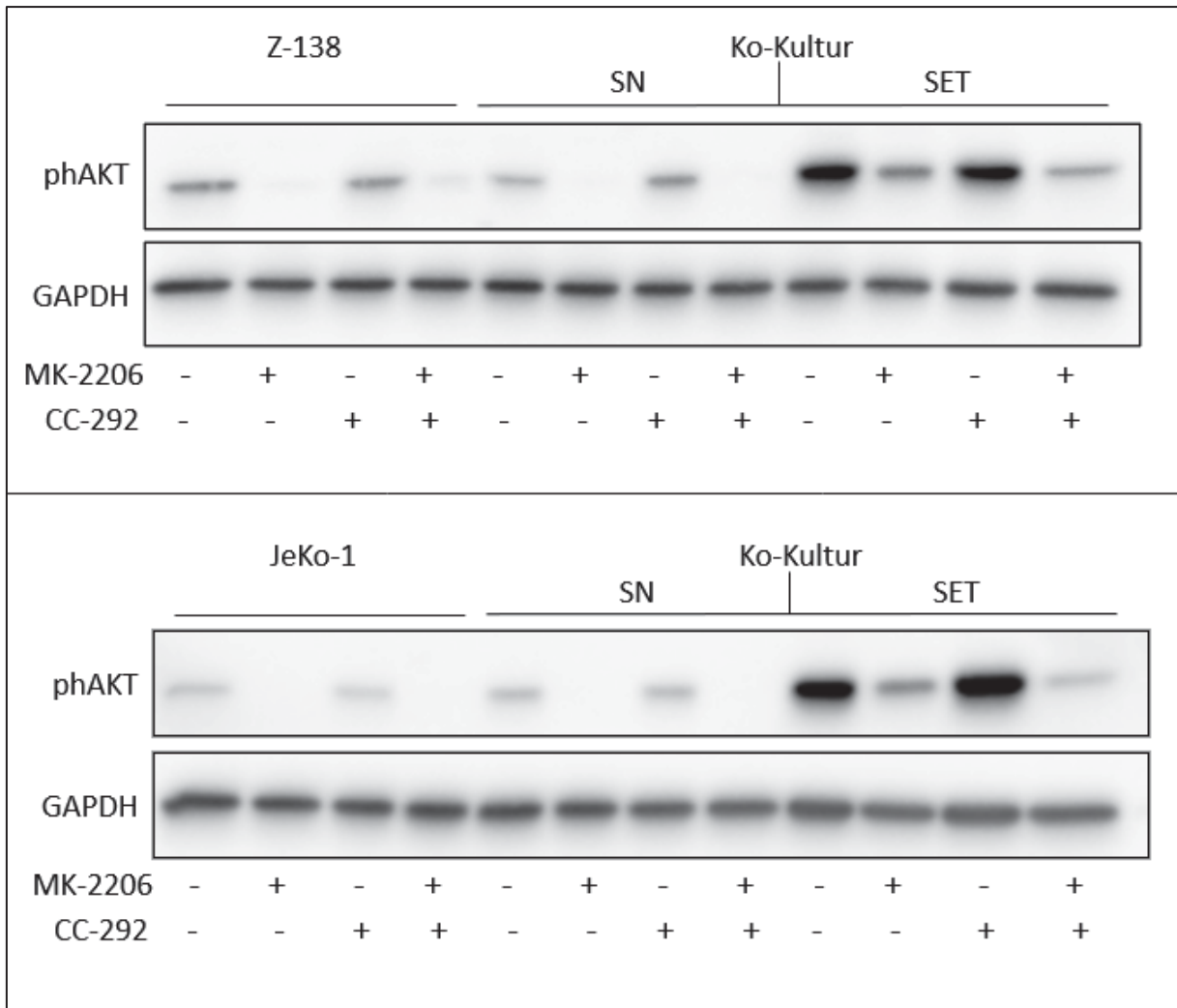


Abbildung 24: Z-138 und JeKo-1 in Mono- und Ko-Kultur, Kombinationsbehandlung mit 5µM CC-292 und 1µM MK-2206

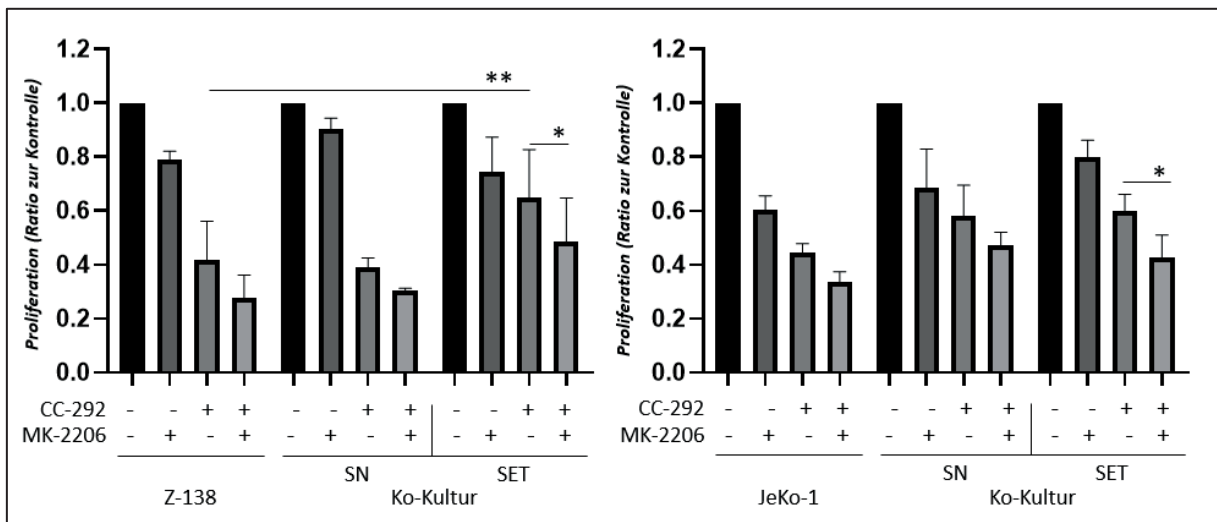


Abbildung 25: Z-138 und JeKo-1 in Mono- und Ko-Kultur 48h nach Kombinationstherapie mit 5µM CC-292 und 1µM MK-2206

4.5.3 Untersuchung des Einnistungsverhaltens der MCL-Zellen unter der Therapie mit MK-2206

Um nachzuweisen, dass die Hemmung der gesteigerten pAKT Expression in den ko-kultivierten Zellen durch die Behandlung mit MK-2206 nicht darauf beruht, dass durch MK-2206 das Einnistungsverhalten beeinflusst wird, erfolgte die Bestimmung des Verhältnisses in die HS5-Stromazellen eingesteter MCL-Zellen zu im Überstand verbliebenen MCL-Zellen. Wie in Abb.26 dargestellt, ergab sich kein Unterschied im Einnistungsverhalten der Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die verminderte Induktion der pAKT Expression in den MK-2206 behandelten MCL-Zellen lediglich auf eine verminderte Einnistung anstatt auf die Akt Hemmung zurückzuführen ist.

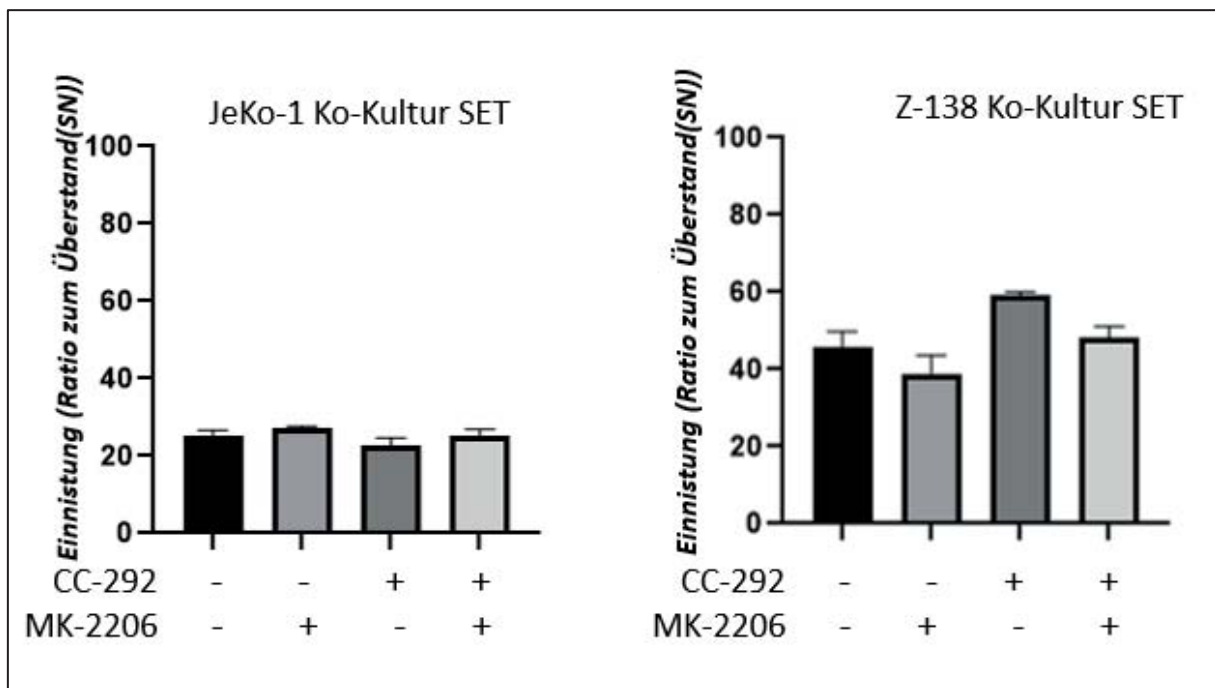


Abbildung 26: Anteil eingesteter (SET) MCLs zu MCLs im Überstand (SN) in Ko-Kultur

4.6 Expression des AKT-Downstream-Targets FOXO1 unter der Therapie mit MK-2206

Wie in Abbildung 14/15 unter 4.3 gezeigt wurde, führte die gesteigerte AKT-Aktivität in den ko-kultivierten, eingesteten MCL-Zellen zu einer Zunahme der Expression des AKT-Downstream-Targets FOXO1 sowie zu einer verminderten Translokation desselben in den Nukleus. Es wurde deshalb im Folgenden untersucht, ob die Kombination von CC-292 mit MK-2206 neben der Hemmung der AKT-Überaktivität auch eine vermehrte Translokation von FOXO1 in den Nukleus bewirkt und damit eine Zunahme der Apoptose induziert. Hierfür wurden MCL-Zellen der Linien JeKo-1 und Z-138 zunächst mit 1µM MK-2206 behandelt. 24h nach Behandlungsbeginn wurden nach MACS-Separation Proteinlysate hergestellt und die Proteine mittels Fraktionierung, wie unter 3.2.3.5 beschrieben, in ihre zytoplasmatischen (CP), sowie nukleären (löslich=Sol, chromatingebunden= CB) Anteile aufgetrennt. Die Expression von FOXO1 in den unterschiedliche Zellkompartimenten wurde dann mittels Western Blot-Analyse verglichen. Wie in Abbildung 27 dargestellt, zeigte sich sowohl bei Z-138 als auch bei

JeKo-1 ein deutlicher Anstieg der FOXO1 Expression im Nukleus (Sol) durch die Behandlung mit MK-2206 allein.

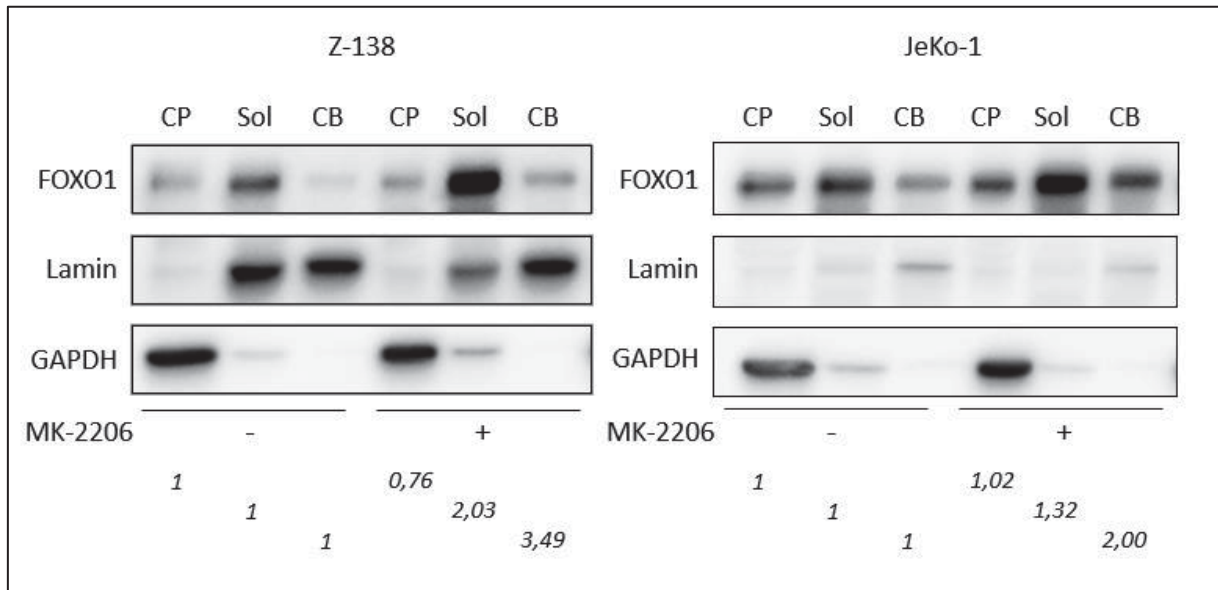


Abbildung 27: FOXO1 Expression nach Behandlung mit 1 μ M MK-2206

Im nächsten Schritt wurden MCL-Zellen der Linien JeKo-1 und Z-138 in Ko-Kultur mit den stromalen Feederlayerzellen HS-5 mit 5 μ M CC-292 und 1 μ M MK-2206 allein oder in Kombination behandelt. 24h nach Behandlungsbeginn wurden nach MACS-Separation Proteinlysate hergestellt und die Proteine mittels Fraktionierung, wie unter 3.2.3.5 beschrieben, in ihre zytoplasmatischen und nukleären Anteile aufgetrennt. Die Expression von FOXO1 in den unterschiedliche Zellkompartimenten wurde dann mittels Western Blot-Analyse verglichen. Die Hinzunahme von MK-2206 zu der Therapie mit CC-292 führte sowohl bei Z-138 als auch bei JeKo-1 ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg der FOXO1 Expression im Nukleus (Sol) (Abb. 28).

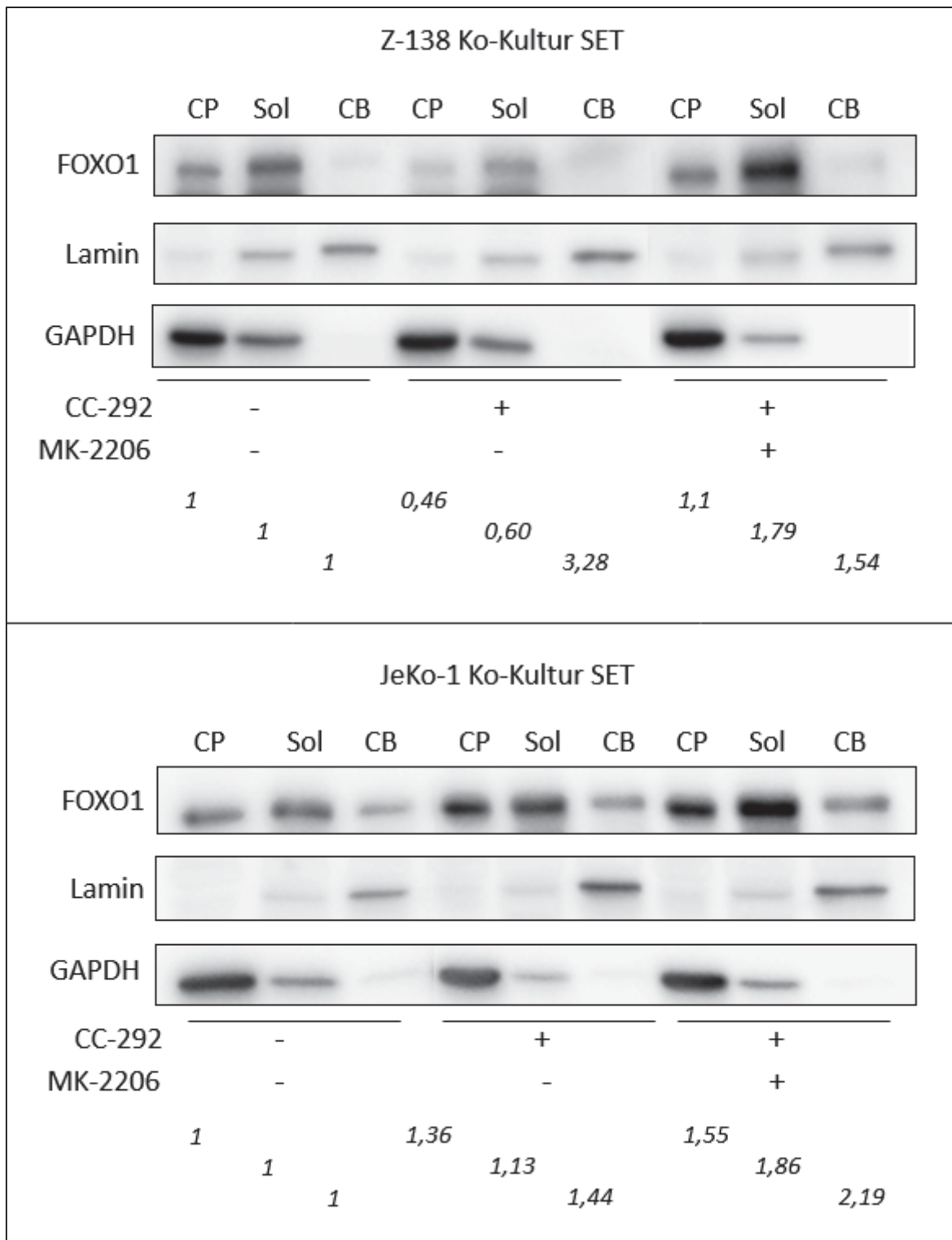


Abbildung 28: FOXO1-Expression

4.7 Apoptoseinduktion durch die Kombinationstherapie mit CC-292 und MK-2206

Aufgrund der Ergebnisse in 4.6 wurde untersucht, ob die verbesserte Translokation von FOXO1 in den Nukleus unter der Kombinationstherapie mit CC-292 und MK-2206 auch mit einer Steigerung der Apoptoserate assoziiert ist. Hierzu erfolgte nach 48h der Behandlung ko-

kultivierter Z-138 Zellen mit CC-292 und MK-2206 die Durchführung der Apoptose-Messung mittels FACS. Hierbei zeigten die Lymphomzellen unter CC-292 Behandlung nur eine geringe Apoptoserate unter 20%. Durch die Kombination mit dem AKT-Inhibitor MK-2206 wurde die Anzahl apoptotischer Zellen signifikant erhöht. (CC-292=0,86 Kombi=0,77; p=0,047) (Abb.29)

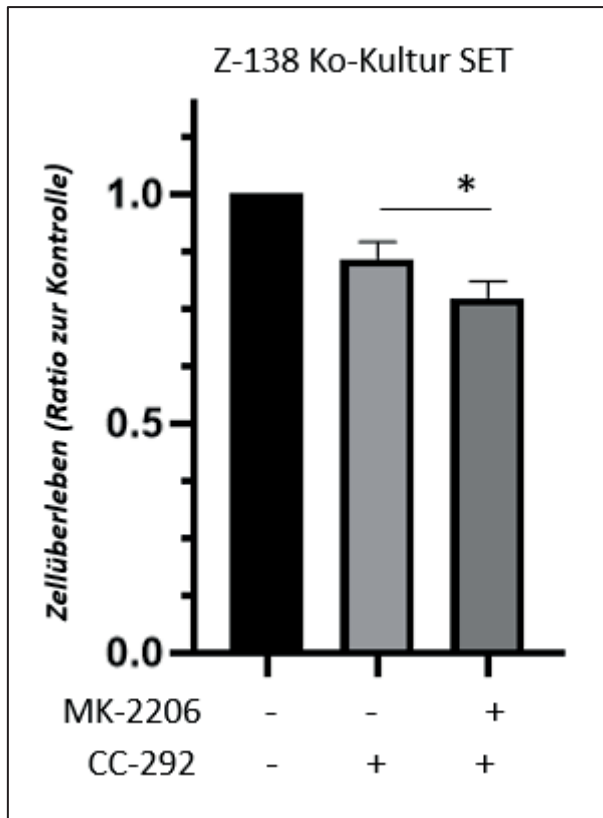


Abbildung 29: Apoptoserate von Z-138 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle Z 48h nach 1µM MK-2206 bzw. 5µM CC-292 Behandlung und FACS-Analyse

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Kombination des BTK-Inhibitors CC-292 mit dem AKT-Inhibitor MK-2206 durch die Hemmung der stromazell-induzierten AKT-Überaktivität und der damit einhergehenden Steigerung der nukleären Expression seines pro-apoptotischen Downstream-Targets FOXO1 eine vielversprechende Möglichkeit zur Überwindung der Stromazell-induzierten CC-292 Resistenz im MCL darstellt.

5 Diskussion

In der Behandlung des MCL stellen vor allem die refraktären und rezidierten Erkrankungen, die durch sehr aggressive klinische Verläufe gekennzeichnet sind, die Medizin vor eine große Herausforderung. Somit ist eine weitere Erforschung der Pathogenese des MCL und die Entwicklung neuer Therapiekonzepte von großer Bedeutung. Gerade in den letzten Jahren ermöglichte die Entwicklung zielgerichteter Therapeutika eine Verbesserung in Behandlung und Prognose des MCL (73, 74). Die Identifikation für die Pathogenese relevanter Signalwege führte bereits zu der Entwicklung einer Vielzahl an Substanzen, wie beispielsweise Inhibitoren des BTK und des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges (75). Der BTK-Inhibitor Ibrutinib wurde bereits als wichtiger Baustein in der Therapie etabliert und konnte die Überlebensraten verbessern (76). Dennoch stellt vor allem die Ibrutinib-Resistenz eine Herausforderung dar, denn Ibrutinib-Versager zeigen deutlich schlechtere Überlebensraten (69, 77). Die molekularen Grundlagen dieser Resistenz zu verstehen und sie zu überwinden ist deshalb von großer Bedeutung.

Es wurde bereits gezeigt, dass hierbei unter anderem die Tumormikroumgebung einen großen Einfluss hat (68). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb der Einfluss der Tumorzell-Interaktion mit seiner Mikroumgebung bezüglich der Sensitivität gegenüber dem BTK-Inhibitor CC-292 untersucht.

In dieser Arbeit wurde die Tumormikroumgebung durch die humanen HS-5 Feederlayerzellen simuliert. HS-5 ist schon seit vielen Jahren als Knochenmark-Stromazelle etabliert, um Interaktionen zwischen hämatopoetischen Zellen und ihrem Mikromilieu darzustellen (78, 79). Doch ist dies als vereinfachtes Modell zu verstehen, da die „physiologische“ Tumormikroumgebung aus verschiedenen Zelltypen und Matrixbestandteilen besteht (61).

5.1 Einfluss der Tumormikroumgebung auf die MCL-Zellen

In Ko-Kulturversuchen (Abb. 10/11) konnte gezeigt werden, dass die MCL-Zellen unter CC-292-Behandlung in Ko-Kultur im Vergleich zur Monokultur eine geringere Therapiesensitivität bezüglich Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion aufwiesen, was einen protektiven Effekt der Tumormikroumgebung postuliert. Die Analyse der Proteinexpression ergab eine gesteigerte AKT-Aktivität in Form einer deutlich erhöhten pAKT-Expression in den ko-kultivierten MCL-Zellen (Abb. 12). Eine Aktivierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalweges als möglichen Resistenzmechanismus gegenüber einer Therapie mit Ibrutinib beobachteten auch Zhao et al. (80). Die Hochregulation des PI3K-AKT-mTOR-Signalweges stellt einen zu BTK alternativen Pfad des BTK-Signalweges dar, wodurch die CC-292-induzierte Hemmung der BTK-vermittelten Aktivierung nachgeschalteter Kinasen und Mediatoren, wie beispielsweise des Ras/Raf/MAP/ERK-Signalweges oder NF- κ B und die damit einhergehende Steigerung von Proliferation und Zellüberleben umgangen werden kann (75). So kann Proteinsynthese und Zellwachstum weiterhin stattfinden (81, 82). Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass die Hochregulation des AKT-Signalweges durch die Interaktion der MCL-Zellen mit der Tumormikroumgebung einen möglichen Mechanismus zur Entwicklung einer Resistenz gegenüber CC-292 darstellt.

Diese Hypothese wird gestützt durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, wobei die AKT-Signalkaskade als wichtiger Mediator für die Sensitivität gegenüber BTK-Inhibition mit Ibrutinib, sowie in der Interaktion von MCL-Zellen mit der Tumormikroumgebung identifiziert wurde (64, 80).

In Hinblick auf die Interaktion zwischen MCL und seiner Tumormikroumgebung stellte sich die Frage, ob ein direkter Kontakt zwischen den Zellen nötig ist oder auch Mediatoren über die Umgebung ausgetauscht werden können, um den Effekt der Stromazellen auf die MCL-Zellen zu induzieren.

In den Ko-Kultur-Versuchen wurde deshalb zwischen eingemasteten MCL-Zellen und denen im Überstand unterschieden. Diese differenzierte Fragestellung wurde in den beiden oben erwähnten Publikationen (64, 80) im Hinblick auf die Bedeutung von AKT als ein durch Interaktion mit der Tumormikroumgebung induzierter Mediator einer BTK-Inhibitor-Resistenz noch nicht adressiert, weshalb die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diesbezüglich neue Erkenntnisse liefert. Wie in Abb. 10 und 12 gezeigt, konnte sowohl in den Zellzählungen als auch bei der Proteinexpression ein Unterschied zwischen eingemasteten Zellen und Zellen im Überstand festgestellt werden. Die Zellen im Überstand zeigten vergleichbares Verhalten zu den Zellen in Monokultur. Die eingemasteten Zellen zeigten eine erhöhte Proliferation, sowie erhöhte pAKT-Expression. Von besonderer Bedeutung in diesem Kontext ist die Untersuchung des Einnistungsverhaltens, um auszuschließen, dass die dargestellten Effekte auf verminderte Einnistung der MCL-Zellen zurückzuführen sind. Sowohl unter Einzel- als auch Kombinationstherapie mit den Inhibitoren waren keine Unterschiede im Einnistungsverhalten im Vergleich zur unbehandelten Ko-Kultur nachweisbar (Abb. 26). Um die Hypothese der Notwendigkeit eines direkten Zell-Zell-Kontakts für die Induktion Tumormikroumgebungsvermittelter Ereignisse zu untermauern, wurde ein Versuchsaufbau, wie in 4.2 beschrieben, gewählt. Die Inserts dienten hierbei als Barriere zwischen den MCL-Zellen und den HS-5 Feederlayerzellen und verhinderten somit den direkten Kontakt durch die fehlende Möglichkeit der Einnistung der Lymphomzellen. Wie in Abb. 13 gezeigt, verhielt sich dabei die MCL-Zellen in den Inserts ähnlich wie die Zellen in Monokultur und im Überstand und zeigten eine höhere Sensibilität gegenüber dem BTK-Inhibitor CC-292 als die eingemasteten Zellen in Ko-Kultur. Dies bekräftigt die Annahme, dass ein direkter Zell-Zell-Kontakt zur protektiven Wirkung durch die Tumormikroumgebung notwendig ist.

Arvidsson et al. verglichen die Unterschiede zwischen in Ko-Kultur befindlichen adhärennten MCL und denen in Suspension, mit besonderem Augenmerk auf die Genexpression. Die Untersuchungen identifizierten 1050 in adhärennten und nicht-adhärennten MCL-Zellen differentiellen exprimierten Gene. Dabei waren insbesondere Gene, die für Apoptose-Hemmung, den B-Zell-Signalweg und Regulation der Proliferation verantwortlich sind, in den adhärennten Zellen überexprimiert (83). Lvin et al. verwendeten einen ähnlichen Versuchsansatz wie in der vorliegenden Arbeit, um die Bedeutung des direkten Zell-Zell-Kontakts zu eruieren. Dabei konnten sie einen starken Anstieg des Zytokins BAFF, das B-Zell-Proliferation und Überleben fördert in der adhärennten Ko-Kultur nachweisen (84). Auch Guan et al. untersuchten die Unterschiede zwischen MCL-Zellen mit direktem Kontakt zu den Stromazellen zu Zellen in Suspension bezüglich Proliferation und Apoptose, wobei durch den direkten Zell-Zell-Kontakt ein deutlicher Überlebens- und Proliferationsvorteil zu sehen war

(71). Die Bedeutung des direkten Zell-Zell-Kontakts für Tumormikroumgebung-vermittelte Ereignisse konnte auch für das Ansprechen auf eine Therapie mit Doxorubicin gezeigt werden (63). Der in dieser Publikation (63) beschriebene Zusammenhang mit einer NF- κ B-Aktivierung in den ko-kultivierten MCL-Zellen weist auf einen ähnlichen Mechanismus der Resistenzentwicklung durch Umgehung des BTK-Signalwegs mittels Aktivierung nachgeschalteter Kinasen und Mediatoren hin wie in der vorliegenden Arbeit.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass ein direkter Kontakt zwischen den MCL-Zelllinien und den stromalen Feederlayerzellen notwendig ist, um die Sensibilität gegenüber dem BTK-Inhibitor herabzusetzen.

5.2 Bedeutung des AKT-Downstream Targets FOXO1

FOXO1 ist ein Downstream-Target von AKT und hat als Transkriptionsfaktor pro-apoptotische Wirkung. Bei der Analyse von pFOXO1 als bekanntes pAKT-Downstream-Target im Western Blot zeigte sich eine deutliche Zunahme der Expression in eingesteten MCL-Zellen (SET) (Abb. 14). Wie bereits in anderen Tumorentitäten wie z.B. dem NSCLC beschrieben, induziert die Phosphorylierung von FOXO1 über aktives AKT eine Translokation von FOXO1 in das Zytoplasma, was dazu führt, dass FOXO1-vermittelte Vorgänge, wie z.B. Apoptoseinduktion inhibiert werden (85, 86). Die genauere Untersuchung der Verteilung von FOXO1 in den einzelnen Zellkompartimenten ergab in den ko-kultivierten MCL-Zellen eine geringere Expression im Nukleus im Vergleich zu den MCL-Zellen in Monokultur. Zudem zeigte sich in der Ko-Kultur eine geringere Apoptoseinduktion unter CC-292 Behandlung im Vergleich zur Monokultur. Diese Hemmung der Apoptose zeigt, dass die verminderte FOXO1 Konzentration im Zellkern auch einen Einfluss auf seine Funktionalität hat und ist mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar: Im klassischen Hodgkin-Lymphom konnte beispielsweise eine durch pAKT vermittelte Suppression von FOXO1 im Zellkern nachgewiesen werden, die durch Hemmung der AKT-Expression aufgehoben werden konnte und eine Steigerung der Apoptose zur Folge hatte (87). Im MCL konnte bereits ein ähnlicher Effekt anhand FOXO3, einem weiteren Tumorsuppressor der FOXO-Familie, gezeigt werden, wobei in aktiven MCL-Zellen die zytoplasmatische Lokalisation in Verbindung mit FOXO3 Inaktivität nachgewiesen wurde. Mittels Hemmung der Translokation aus dem Zellkern, sowie mittels des AKT-Inhibitors TCP-B konnte Apoptose durch aktiviertes FOXO3 induziert werden (88).

Diese Beobachtungen lassen die Hypothese zu, dass der protektive Effekt der Tumormikroumgebung gegenüber der Behandlung mit CC-292 über eine pAKT-vermittelte Inaktivierung des pro-apoptotischen Transkriptionsfaktors FOXO1 induziert wird.

5.3 AKT als Mediator der Tumormikroumgebung-vermittelten Reduktion der Sensitivität gegenüber CC-292

Um zu überprüfen, ob die verminderte Sensitivität der MCL-Zelllinie JeKo-1 gegenüber CC-292 direkt von der erhöhten Expression von pAKT in den ko-kultivierten, eingesteten MCL-Zellen abhängt, wurde die Expression von AKT mittels siRNA gehemmt.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die mit AKT-siRNA transfizierten JeKo-1-Zellen, die sich in Ko-Kultur mit direktem Zell-Zell-Kontakt befanden, im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten, in den Stromazellen eingenisteten MCL-Zellen, eine signifikante Abnahme der Proliferationsrate unter CC-292 Behandlung aufwiesen.

Im parallel durchgeführten Western Blot zeigten die AKT-siRNA-transfizierten JeKo-1 Zellen prinzipiell eine geringere Expression von AKT und pAKT als diejenigen, die lediglich mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Beim Vergleich der eingenisteten MCL-Zellen (siRNA-K vs. siRNA-AKT) war eine Erhöhung der pAKT Expression in den AKT-siRNA transfizierten Zellen nach wie vor sichtbar, jedoch nicht mehr in der gleichen Intensität wie in den kontroll-transfizierten Zellen (Abb. 20). Dies zeigt, dass der Effekt der Tumormikroumgebung auf die AKT-Proteinexpression zumindest teilweise gehemmt werden konnte. Dass dennoch ein signifikanter Effekt auf die Proliferationsrate unter CC-292 beobachtet werden konnte, lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass in Anbetracht der insgesamt sehr starken Zunahme der pAKT Expression in den ko-kultivierten, eingenisteten Zellen die vergleichsweise geringe AKT-Hemmung durch die siRNA (20%) die Abnahme der pAKT Level mittels Western Blot nicht sensitiv genug detektiert werden konnte, die vorhandene Hemmung jedoch für den funktionellen Effekt ausreichend ist.

Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass die durch die Interaktion der MCL-Zellen mit der Tumormikroumgebung vermittelte Reduktion der Sensitivität gegenüber CC-292 von einer Überexpression von AKT abhängt.

Um diese Hypothese bei eingeschränkter Beurteilbarkeit des Effekts der si-RNA-vermittelten AKT-Inhibition aufgrund der unzureichenden Hemmung der Proteinexpression weiter zu stärken, wurde die AKT-Expression pharmakologisch gehemmt.

Hierzu wurde die Proteinkinase B mithilfe von MK-2206 gehemmt. Der panAKT-Inhibitor wirkt, indem er die Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung verhindert (55). Wang et al. konnten in DLBCL Zellen, wo eine Korrelation zwischen erhöhtem pAKT und vermindertem progressionsfreiem Überleben berichtet wurde, bereits eine gute Wirksamkeit von MK-2206 zeigen. Die Behandlung mit MK-2206 induzierte hier neben einem Rückgang von pAKT eine Regulation zahlreicher Downstream-Faktoren, die in Proliferationshemmung und Apoptosesteigerung involviert sind (89). In Non-Hodgkin-Lymphomen konnte weiterhin *in vitro* und *in vivo* ein gutes Ansprechen auf eine Kombinationstherapie mit einem mTOR- und einem AKT-Inhibitor gezeigt werden (90).

MK-2206 fand zudem bereits Anwendung in Phase II-Studien im refraktären Nierenzell-Karzinom und in der Brustkrebs-Studie I-SPY (91, 92).

Vergleicht man die eingenisteten MCL-Zellen unter CC-292 Behandlung mit denen unter Kombinations-Behandlung, konnte ein deutlich besseres Therapie-Ansprechen im Sinne einer signifikanten Reduktion der Proliferation nach Zugabe von MK-2206 beobachtet werden. Im Zusammenhang mit einer deutlich niedrigeren pAKT Expression in der mit der Kombination behandelten Ko-Kultur kann dies auf den Effekt der MK-2206 Zugabe zurückgeführt werden und impliziert, dass der Schutz, den die Tumormikroumgebung durch Aktivierung von AKT im MCL induziert, durch AKT-Hemmung mit dem Inhibitor MK-2206 wieder aufgehoben werden

kann (Abb. 24 & 25). Die Kombinationstherapie mit zwei Angriffspunkten im BZR-Signalweg stellt somit eine gute Möglichkeit dar, um der Resistenzentwicklung gegenüber CC-292 im Kontext der Tumormikroumgebung entgegenzuwirken und das Therapieansprechen zu verbessern.

Die Rolle von AKT als Mediator einer BTK-Inhibitor-Resistenz im MCL konnten Guan et al. nachweisen, wobei pAKT in Ko-Kultur der MCL-Zellen mit der Tumormikroumgebung stärker exprimiert wurde und durch Hemmung der PI3K Untereinheit p110a die AKT-Aktivierung verhindert und die Resistenz gegenüber Ibrutinib aufgehoben werden. Sie postulierten außerdem, dass hierfür ein direkter Zell-Zell-Kontakt notwendig ist (71). Eine weitere Studie untersuchte den Effekt einer Kombinations-Behandlung mit Ibrutinib und Sotrastaurin, wodurch ebenfalls die Bedeutung von AKT als Angriffspunkt in der Therapie des MCL gezeigt wurde (93). Dass AKT ein wichtiges Target in Ibrutinib-resistenten Zellen ist, konnte auch von Ma et al. nachgewiesen werden. Sowohl in primären MCL-Zellen als auch MCL-Zelllinien resultierte eine erhöhte pAKT Expression in erhöhter Resistenz gegenüber Ibrutinib (94). Eine kombinierte Hemmung von BTK und AKT wurde im Rahmen aktueller Studien auch durch eine neue Klasse von Inhibitoren, welche simultan an mehreren Stellen im BZR-Signalweg angreifen, untersucht. Mittels SRX3305, einem Inhibitor von AKT über Hemmung der PI3K Isoformen und integrierter BTK-Hemmung, konnte eine Zunahme der Apoptose sowie ein Rückgang der Proliferation auch in BTK-Inhibitor-resistenten MCL-Zellen nachgewiesen werden (95). Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit erfolgte die Behandlung der MCL-Zellen allerdings nicht in Ko-Kultur. Die Relevanz des PI3K/AKT/mTOR Signalweges in der Tumormikroumgebungs-vermittelten Resistenz gegen BTK-Inhibitoren wurde auch von Sarkozy et al. gezeigt, indem sie zahlreiche Studien zu Kombinationsbehandlungen des MCLs verglichen (96). Hierbei ist anzuführen, dass mit einem neuen BTK Inhibitor PLS-123 und dem mTOR Inhibitor Everolimus in *in vitro* und *in vivo* ebenfalls ein positiver Effekt durch die duale Behandlung gezeigt werden konnte. Die Proliferation der MCL-Zellen konnte gehemmt und ihre Apoptose gesteigert werden (97). Das Potential der AKT-Hemmung im Kontext der Tumormikroumgebung in der CLL wurde in einer Studie von Shen et al. deutlich. Die Arbeitsgruppe untersuchte CLL-Zelllinien und primäre CLL-Zellen in Mono- und Ko-Kultur mit Mausfibroblasten. Im ersten Schritt konnte in Verbindung mit der Tumormikroumgebung eine Erhöhung von phosphoryliertem Akt und ERK/MAPK und damit verbunden eine erhöhte Resistenz nachgewiesen werden. Eine Kombination aus dem Akt-Inhibitor MK-2206 und dem MEK1/2-Inhibitor Binimetinib zeigte synergistische Effekte den Zellzyklusarrest und die Hemmung der Proliferationsrate betreffend (98). Da MEK1/2 ein Downstream-Target von BTK ist, wurde ebenfalls eine kombinierte Hemmung beider Signalwege durchgeführt. Hierbei wird noch einmal die Komplexität des BZR-Signalweges deutlich.

5.4 FOXO1-Reaktivierung durch AKT-Hemmung über MK-2206

Wie in 4.3 dargestellt, führte die Interaktion der MCL-Zellen mit der Tumormikroumgebung auch zu einer vermehrten pFOXO1 Expression, sodass der Effekt der AKT-Hemmung auf sein Downstream-Target FOXO1 genauer untersucht wurde. Hierbei wurde unter isolierter MK-2206-Behandlung eine erhöhte FOXO1 Expression im Zellkern detektiert. Dadurch wird deutlich, dass sich FOXO1 mit Abwesenheit des AKT-Einflusses im Zellkern befindet und dort seine Funktion als anti-apoptotischer Transkriptionsfaktor erfüllen kann. Maekawa et al

beobachteten denselben Effekt im NSCLC. Durch siRNA hemmten sie AKT und konnten FOXO1 vermehrt im Kern darstellen. Außerdem detektierten sie in diesem Zusammenhang eine erhöhte Apoptose und wiesen damit den pro-apoptotischen Effekt von FOXO1 nach (86).

In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die unter AKT-Inhibition erzielte Relokalisation von FOXO1 in den Zellkern mit einer gesteigerten Apoptose der ko-kultivierten Zellen einhergeht und unterstreicht, dass die AKT induzierte, verminderte FOXO1 Konzentration im Zellkern auch einen Einfluss auf seine Funktionalität hat.

Vergleichbare Ergebnisse liefern Szydolowski et al., die im DLBCL ebenfalls den AKT-Inhibitor MK-2206 anwandten u.a. in Kombination mit dem SYK-Inhibitor R406. Sie ermittelten FOXO1 als wichtigen Effektor der AKT-Hemmung, Apoptose und Zellzyklus-Arrest induzierte (99). Kapoor et al. untersuchten die Ibrutinib Resistenz in CLL und DLBCL und beobachteten, in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, dass die durch AKT-Aktivierung verminderte FOXO1-Lokalisation im Nukleus durch AKT-Hemmung mit MK-2206 erhöht werden und vermehrte Apoptose der Lymphomzellen ausgelöst werden konnte. Die Apoptose war auch nach Hemmung des Transports aus dem Nukleus durch einen Exportin 1 Hemmer erhöht, was zeigt, dass hierfür die Lokalisation von FOXO im Kern verantwortlich ist (100).

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass die Kombination des BTK-Inhibitors CC-292 mit dem AKT-Inhibitor MK-2206 durch die Hemmung der Stromazell-induzierten AKT-Überaktivität und der damit einhergehenden Steigerung der nukleären Expression seines pro-apoptotischen Downstream-Targets FOXO1 eine vielversprechende Möglichkeit zur Überwindung der Stromazell-induzierten CC-292 Resistenz im MCL darstellt.

6 Zusammenfassung

Das Mantelzelllymphom stellt durch seine komplexe Pathogenese und sein klinisch heterogenes Erscheinungsbild mit teilweise sehr aggressiven Verläufen und frühen Rezidiven eine Herausforderung für das klinische Management dar. Hauptcharakteristika der Pathogenese sind die Translokation t(11;14), die in einer Cyclin D1 Überexpression resultiert, sowie Überaktivierung im B-Zell-Rezeptor Signalweg. Zwar konnten durch die Entwicklung zielgerichteter Therapeutika neue Therapiekonzepte etabliert werden, die das Ansprechen und Überleben verbesserten, aber bis heute ist die Prognose des MCLs mit einem medianen Überleben von 5 Jahren ungünstig. Insbesondere Patienten, die auf eine Therapie mit dem BTK-Inhibitor Ibrutinib resistent sind, weisen einen deutlich schlechteren Krankheitsverlauf auf. Es wurde gezeigt, dass hierbei auch die Tumormikroumgebung einen großen Einfluss auf die Resistenz der Lymphom-Zellen hat. Erste Erkenntnisse bezüglich der Rolle der Tumormikroumgebung für die Tumorgenese- und progression des MCL eröffnen bereits Möglichkeiten neuer Therapiekonzepte. Doch trotz Kenntnis einiger Signalkaskaden sind noch ein Großteil der zugrundeliegenden Prozesse unbekannt und die weitere Forschung in diesem Bereich ist von großer Wichtigkeit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Tumorzell-Interaktion mit seiner Mikroumgebung bezüglich der Sensitivität gegenüber dem BTK-Inhibitor CC-292 untersucht

Anhand von Ko-Kultur-Versuchen mit den stromalen Feederlayerzellen HS-5 und den Mantelzelllymphom-Zelllinien Z-138 und JeKo-1 wurde diese Interaktion simuliert und durch Analyse der Proliferation, Apoptose und der Proteinexpressionen wurden die Vorgänge unter CC-292 Behandlung und in Kombination mit dem AKT-Inhibitor MK-2206 untersucht.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die MCL-Zellen unter CC-292-Behandlung in Ko-Kultur im Vergleich zur Monokultur eine geringere Therapiesensitivität bezüglich Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion aufwiesen, was einen protektiven Effekt der Tumormikroumgebung postuliert. Die Analyse der Proteinexpression ergab eine gesteigerte AKT-Aktivität in Form einer deutlich erhöhten pAKT-Expression in den ko-kultivierten MCL-Zellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein für die protektive Wirkung durch die Tumormikroumgebung ein direkter Zell-Zell-Kontakt notwendig ist. Bei der Analyse von pFOXO1 als bekanntes pAKT-Downstream-Target im Western Blot zeigte sich eine deutliche Zunahme der Expression in eingenisteten MCL-Zellen. Die genauere Untersuchung der Verteilung von FOXO1 in den einzelnen Zellkompartimenten ergab in den ko-kultivierten MCL-Zellen eine geringere Expression im Nukleus im Vergleich zu den MCL-Zellen in Monokultur. Zudem zeigte sich in der Ko-Kultur eine geringere Apoptoseinduktion unter CC-292 Behandlung im Vergleich zur Monokultur. Diese Hemmung der Apoptose zeigt, dass die verminderte FOXO1 Konzentration im Zellkern auch einen Einfluss auf seine Funktionalität hat. Diese Beobachtungen lassen die Hypothese zu, dass der protektive Effekt der Tumormikroumgebung gegenüber der Behandlung mit CC-292 über eine pAKT-vermittelte Inaktivierung des pro-apoptotischen Transkriptionsfaktors FOXO1 induziert wird.

Um zu überprüfen, ob die verminderte Sensitivität der MCL-Zelllinie JeKo-1 gegenüber CC-292 direkt von der erhöhten Expression von pAKT in den ko-kultivierten, eingenisteten MCL-

Zellen abhängt, wurde die Expression von AKT mittels siRNA sowie pharmakologisch mithilfe von MK-2206 gehemmt.

Hierbei konnte sowohl mittels siRNA, jedoch in deutlich geringerer Ausprägung, als vor allem auch nach Zugabe von MK-2206 ein besseres Therapie-Ansprechen im Sinne einer signifikanten Reduktion der Proliferation beobachtet werden. Im Zusammenhang mit einer deutlich niedrigeren pAKT Expression in der mit der Kombination von CC-292 und MK-2206 behandelten Ko-Kultur kann dies auf den Effekt der MK-2206 Zugabe zurückgeführt werden und impliziert, dass der Schutz, den die Tumormikroumgebung durch Aktivierung von AKT im MCL induziert, durch AKT-Hemmung mit dem Inhibitor MK-2206 wieder aufgehoben werden kann. Hinsichtlich FOXO1 Aktivität wurde unter MK-2206-Behandlung eine erhöhte FOXO1 Expression im Zellkern detektiert.

Die Kombinationstherapie mit zwei Angriffspunkten im BZR-Signalweg stellt somit eine gute Möglichkeit dar, um der Resistenzentwicklung gegenüber CC-292 im Kontext der Tumormikroumgebung entgegenzuwirken und das Therapieansprechen zu verbessern.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Kombination des BTK-Inhibitors CC-292 mit dem AKT-Inhibitor MK-2206 durch die Hemmung der Stromazell-induzierten AKT-Überaktivität und der damit einhergehenden Steigerung der nukleären Expression seines pro-apoptotischen Downstream-Targets FOXO1 eine vielversprechende Möglichkeit zur Überwindung der Stromazell-induzierten CC-292 Resistenz im MCL darstellt.

In zukünftigen Forschungsarbeiten sollten die Erkenntnisse auch an primären MCLs und *in vivo* überprüft werden. Um die kombinierte Hemmung des BTK- und AKT-Signalweges systematisch zu untersuchen, wäre es zielführend verschiedene Therapeutika-Kombinationen zu vergleichen, um daraus die optimale Kombinations-Behandlung zu etablieren, die den Schutzmechanismus der Tumormikroumgebung wirksam umgeht.

7 Literatur

1. Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, Wolf-Peeters C de, Gatter K et al. Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am J Surg Pathol* 1992; 16(7):637–40. doi: 10.1097/00000478-199207000-00001.
2. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group [see comments]. *Blood* 1994; 84(5):1361–92. doi: 10.1182/blood.V84.5.1361.bloodjournal8451361.
3. Dreyling M, Campo E, Hermine O, Jerkeman M, Le Gouill S, Rule S et al. Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017; 28(suppl_4):iv62-iv71. doi: 10.1093/annonc/mdx223.
4. Zhou Y, Wang H, Fang W, Romaguer JE, Zhang Y, Delasalle KB et al. Incidence trends of mantle cell lymphoma in the United States between 1992 and 2004. *Cancer* 2008; 113(4):791–8. doi: 10.1002/cncr.23608.
5. Joshi K, Hubbard R, Bishton MJ. Population-based study of mantle cell lymphoma: Improvements in survival only seen in younger patients. *Hematol Oncol* 2018. doi: 10.1002/hon.2495.
6. Abrahamsson A, Albertsson-Lindblad A, Brown PN, Baumgartner-Wennerholm S, Pedersen LM, D'Amore F et al. Real world data on primary treatment for mantle cell lymphoma: a Nordic Lymphoma Group observational study. *Blood* 2014; 124(8):1288–95. doi: 10.1182/blood-2014-03-559930.
7. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol* 2005; 131(1):29–38. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05716.x.
8. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD. Mantle Cell Lymphoma: A Clinicopathologic Study of 80 Cases. *Blood* 1997; 89(6):2067–78. doi: 10.1182/blood.V89.6.2067.
9. Hoster E, Rosenwald A, Berger F, Bernd H-W, Hartmann S, Loddenkemper C et al. Prognostic Value of Ki-67 Index, Cytology, and Growth Pattern in Mantle-Cell Lymphoma: Results From Randomized Trials of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *J Clin Oncol* 2016; 34(12):1386–94. doi: 10.1200/JCO.2015.63.8387.
10. A Majlis, W C Pugh, M A Rodriguez, W F Benedict, F Cabanillas. Mantle cell lymphoma: correlation of clinical outcome and biologic features with three histologic variants. *Journal of Clinical Oncology* 1997; 15(4):1664–71. doi: 10.1200/JCO.1997.15.4.1664.

11. Mozos A, Royo C, Hartmann E, Jong D de, Baró C, Valera A et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 2009; 94(11):1555–62. doi: 10.3324/haematol.2009.010264.
12. Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K, Borrebaeck CAK. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood* 2008; 111(2):800–5. doi: 10.1182/blood-2007-06-093401.
13. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; 127(20):2375–90. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569.
14. Donnellan R, Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. *MP, Mol Pathol* 1998; 51(1):1–7. doi: 10.1136/mp.51.1.1.
15. Quintanilla-Martinez L, Davies-Hill T, Fend F, Calzada-Wack J, Sorbara L, Campo E et al. Sequestration of p27Kip1 protein by cyclin D1 in typical and blastic variants of mantle cell lymphoma (MCL): implications for pathogenesis. *Blood* 2003; 101(8):3181–7. doi: 10.1182/blood-2002-01-0263.
16. Beà S, Valdés-Mas R, Navarro A, Salaverria I, Martín-Garcia D, Jares P et al. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(45):18250–5. doi: 10.1073/pnas.1314608110.
17. Zhang J, Jima D, Moffitt AB, Liu Q, Czader M, Hsi ED et al. The genomic landscape of mantle cell lymphoma is related to the epigenetically determined chromatin state of normal B cells. *Blood* 2014; 123(19):2988–96. doi: 10.1182/blood-2013-07-517177.
18. Yang P, Zhang W, Wang J, Liu Y, An R, Jing H. Genomic landscape and prognostic analysis of mantle cell lymphoma. *Cancer Gene Ther* 2018; 25(5-6):129–40. doi: 10.1038/s41417-018-0022-5.
19. Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, van Hoof A, Kluijn-Nelemans HC et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 2008; 111(2):558–65. doi: 10.1182/blood-2007-06-095331.
20. Klapper W, Hoster E, Determann O, Oschlies I, van der Laak J, Berger F et al. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop* 2009; 2(2):103–11. doi: 10.1007/s12308-009-0036-x.
21. Determann O, Hoster E, Ott G, Wolfram Bernd H, Loddenkemper C, Leo Hansmann M et al. Ki-67 predicts outcome in advanced-stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-CD20 immunochemotherapy: results from randomized trials of the European MCL Network and the German Low Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2008; 111(4):2385–7. doi: 10.1182/blood-2007-10-117010.
22. Maddocks K. Update on mantle cell lymphoma. *Blood* 2018; 132(16):1647–56. doi: 10.1182/blood-2018-03-791392.

23. Vose JM. Mantle cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. *Am J Hematol* 2017; 92(8):806–13. doi: 10.1002/ajh.24797.
24. Kluijn-Nelemans HC, Hoster E, Hermine O, Walewski J, Geisler CH, Trneny M et al. Treatment of Older Patients With Mantle Cell Lymphoma (MCL): Long-Term Follow-Up of the Randomized European MCL Elderly Trial. *J Clin Oncol* 2019; JCO1901294. doi: 10.1200/JCO.19.01294.
25. Rule S. The modern approach to mantle cell lymphoma. *Hematol Oncol* 2019; 37 Suppl 1:66–9. doi: 10.1002/hon.2596.
26. Jain AG, Chang C-C, Ahmad S, Mori S. Leukemic Non-nodal Mantle Cell Lymphoma: Diagnosis and Treatment. *Curr Treat Options Oncol* 2019; 20(12):85. doi: 10.1007/s11864-019-0684-8.
27. Abrisqueta P, Scott DW, Slack GW, Steidl C, Mottok A, Gascoyne RD et al. Observation as the initial management strategy in patients with mantle cell lymphoma. *Ann Oncol* 2017; 28(10):2489–95. doi: 10.1093/annonc/mdx333.
28. Gerson JN, Handorf E, Villa D, Gerrie AS, Chapani P, Li S et al. Survival Outcomes of Younger Patients With Mantle Cell Lymphoma Treated in the Rituximab Era. *J Clin Oncol* 2019; 37(6):471–80. doi: 10.1200/JCO.18.00690.
29. Hermine O, Hoster E, Walewski J, Bosly A, Stilgenbauer S, Thieblemont C et al. Addition of high-dose cytarabine to immunochemotherapy before autologous stem-cell transplantation in patients aged 65 years or younger with mantle cell lymphoma (MCL Younger): a randomised, open-label, phase 3 trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *The Lancet* 2016; 388(10044):565–75. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00739-X.
30. Hermine O, Jiang L, Walewski J, Bosly A, Thieblemont C, Szymczyk M et al. High-Dose Cytarabine and Autologous Stem-Cell Transplantation in Mantle Cell Lymphoma: Long-Term Follow-Up of the Randomized Mantle Cell Lymphoma Younger Trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *J Clin Oncol* 2023; 41(3):479–84. doi: 10.1200/JCO.22.01780.
31. Dreyling M, Doorduijn JK, Gine E, Jerkeman M, Walewski J, Hutchings M et al. Efficacy and Safety of Ibrutinib Combined with Standard First-Line Treatment or As Substitute for Autologous Stem Cell Transplantation in Younger Patients with Mantle Cell Lymphoma: Results from the Randomized Triangle Trial By the European MCL Network. *Blood* 2022; 140(Supplement 1):1–3. doi: 10.1182/blood-2022-163018.
32. Robak T, Jin J, Pylypenko H, Verhoef G, Siritanaratkul N, Drach J et al. Frontline bortezomib, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (VR-CAP) versus rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) in transplantation-ineligible patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma: final overall survival results of a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet Oncology* 2018; 19(11):1449–58. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30685-5.

33. Arora PC, Portell CA. Novel therapies for relapsed/refractory mantle cell lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2018; 31(1):105–13. doi: 10.1016/j.beha.2017.10.010.
34. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* 2012; 120(6):1175–84. doi: 10.1182/blood-2012-02-362624.
35. Hibbs ML, Dunn AR. Lyn, a src-like tyrosine kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(3):397–400. doi: 10.1016/s1357-2725(96)00104-5.
36. Rolli V, Gallwitz M, Wossning T, Flemming A, Schamel WWA, Zurn C et al. Amplification of B cell antigen receptor signaling by a Syk/ITAM positive feedback loop. *Mol Cell* 2002; 10(5):1057–69. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00739-6.
37. Dustin LB, Plas DR, Wong J, Hu YT, Soto C, Chan AC et al. Expression of dominant-negative src-homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 results in increased Syk tyrosine kinase activity and B cell activation. *J Immunol* 1999; 162(5):2717–24.
38. Mohamed AJ, Nore BF, Christensson B, Smith CI. Signalling of Bruton's tyrosine kinase, Btk. *Scand J Immunol* 1999; 49(2):113–8. doi: 10.1046/j.1365-3083.1999.00504.x.
39. Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT, Mills D, Pugh-Bernard AE, Cambier J. B cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol* 2004; 41(6-7):599–613. doi: 10.1016/j.molimm.2004.04.008.
40. Herman SEM, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 2011; 117(23):6287–96. doi: 10.1182/blood-2011-01-328484.
41. Karleen M Nicholson, Neil G Anderson. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling* 2002; 14(5):381–95. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656801002716>.
42. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005; 9(1):59–71. doi: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00337.x.
43. Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell* 2005; 8(3):179–83. doi: 10.1016/j.ccr.2005.08.008.
44. Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 16):2903–10.
45. Derek P. Brazil, Brian A. Hemmings. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends in Biochemical Sciences* 2001; 26(11):657–64. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968000401019582>.
46. Dal Col J, Zancai P, Terrin L, Guidoboni M, Ponzoni M, Pavan A et al. Distinct functional significance of Akt and mTOR constitutive activation in mantle cell lymphoma. *Blood* 2008; 111(10):5142–51. doi: 10.1182/blood-2007-07-103481.

47. Schmitt-Ney M. The FOXO's Advantages of Being a Family: Considerations on Function and Evolution. *Cells* 2020; 9(3). doi: 10.3390/cells9030787.
48. Szydłowski M, Jabłońska E, Juszczyński P. FOXO1 transcription factor: a critical effector of the PI3K-AKT axis in B-cell development. *Int Rev Immunol* 2014; 33(2):146–57. doi: 10.3109/08830185.2014.885022.
49. Dejean AS, Hedrick SM, Kerdiles YM. Highly specialized role of Forkhead box O transcription factors in the immune system. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14(4):663–74. doi: 10.1089/ars.2010.3414.
50. Evans EK, Tester R, Aslanian S, Karp R, Sheets M, Labenski MT et al. Inhibition of Btk with CC-292 provides early pharmacodynamic assessment of activity in mice and humans. *J Pharmacol Exp Ther* 2013; 346(2):219–28. doi: 10.1124/jpet.113.203489.
51. Aalipour A, Advani RH. Bruton tyrosine kinase inhibitors: a promising novel targeted treatment for B cell lymphomas. *Br J Haematol* 2013; 163(4):436–43. doi: 10.1111/bjh.12573.
52. Schafer PH, Kivitz AJ, Ma J, Korish S, Sutherland D, Li L et al. Spebrutinib (CC-292) Affects Markers of B Cell Activation, Chemotaxis, and Osteoclasts in Patients with Rheumatoid Arthritis: Results from a Mechanistic Study. *Rheumatol Ther* 2019. doi: 10.1007/s40744-019-00182-7.
53. Lee-Vergés E, Hanna BS, Yazdanparast H, Rodríguez V, Rodríguez ML, Giró A et al. Selective BTK inhibition improves bendamustine therapy response and normalizes immune effector functions in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 2019; 144(11):2762–73. doi: 10.1002/ijc.32010.
54. Bond DA, Alinari L, Maddocks K. Bruton tyrosine kinase inhibitors for the treatment of mantle cell lymphoma: review of current evidence and future directions. *Clin Adv Hematol Oncol* 2019; 17(4):223–33.
55. Hirai H, Sootome H, Nakatsuru Y, Miyama K, Taguchi S, Tsujioka K et al. MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(7):1956–67. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1012.
56. Lee EK, Tan-Wasielewski Z, Aghajanian C, Coleman RL, Curtis J, Hirsch MS et al. Results of an abbreviated phase II study of AKT inhibitor MK-2206 in the treatment of recurrent platinum-resistant high grade serous ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma (NCT 01283035). *Gynecol Oncol Rep* 2020; 32:100546. doi: 10.1016/j.gore.2020.100546.
57. Oki Y, Fanale M, Romaguera J, Fayad L, Fowler N, Copeland A et al. Phase II study of an AKT inhibitor MK2206 in patients with relapsed or refractory lymphoma. *Br J Haematol* 2015; 171(4):463–70. doi: 10.1111/bjh.13603.
58. Petrich AM, Leshchenko V, Kuo P-Y, Xia B, Thirukonda VK, Ulahannan N et al. Akt inhibitors MK-2206 and nelfinavir overcome mTOR inhibitor resistance in diffuse large B-

- cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18(9):2534–44. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1407.
59. Yap TA, Yan L, Patnaik A, Fearen I, Olmos D, Papadopoulos K et al. First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2011; 29(35):4688–95. doi: 10.1200/JCO.2011.35.5263.
 60. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 2009; 114(16):3367–75. doi: 10.1182/blood-2009-06-225326.
 61. Kumar D, Xu ML. Microenvironment Cell Contribution to Lymphoma Immunity. *Front Oncol* 2018; 8:288. doi: 10.3389/fonc.2018.00288.
 62. Papin A, Le Gouill S, Chiron D. Rationale for targeting tumor cells in their microenvironment for mantle cell lymphoma treatment. *Leuk Lymphoma* 2018; 59(5):1064–72. doi: 10.1080/10428194.2017.1357177.
 63. Medina DJ, Goodell L, Glod J, Gélinas C, Rabson AB, Strair RK. Mesenchymal stromal cells protect mantle cell lymphoma cells from spontaneous and drug-induced apoptosis through secretion of B-cell activating factor and activation of the canonical and non-canonical nuclear factor κ B pathways. *Haematologica* 2012; 97(8):1255–63. doi: 10.3324/haematol.2011.040659.
 64. Rudelius M, Rosenfeldt MT, Leich E, Rauert-Wunderlich H, Solimando AG, Beilhack A et al. Inhibition of focal adhesion kinase overcomes resistance of mantle cell lymphoma to ibrutinib in the bone marrow microenvironment. *Haematologica* 2018; 103(1):116–25. doi: 10.3324/haematol.2017.177162.
 65. Saba NS, Liu D, Herman SEM, Underbayev C, Tian X, Behrend D et al. Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF- κ B activation in mantle cell lymphoma. *Blood* 2016; 128(1):82–92. doi: 10.1182/blood-2015-11-681460.
 66. Balsas P, Palomero J, Eguileor Á, Rodríguez ML, Vegliante MC, Planas-Rigol E et al. SOX11 promotes tumor protective microenvironment interactions through CXCR4 and FAK regulation in mantle cell lymphoma. *Blood* 2017; 130(4):501–13. doi: 10.1182/blood-2017-04-776740.
 67. Papin A, Tessoulin B, Bellanger C, Moreau A, Le Bris Y, Maisonneuve H et al. CSF1R and BTK inhibitions as novel strategies to disrupt the dialog between mantle cell lymphoma and macrophages. *Leukemia* 2019; 33(10):2442–53. doi: 10.1038/s41375-019-0463-3.
 68. Sircar A, Chowdhury SM, Hart A, Bell WC, Singh S, Sehgal L et al. Impact and Intricacies of Bone Marrow Microenvironment in B-cell Lymphomas: From Biology to Therapy. *Int J Mol Sci* 2020; 21(3). doi: 10.3390/ijms21030904.
 69. Martin P, Maddocks K, Leonard JP, Ruan J, Goy A, Wagner-Johnston N et al. Postibrutinib outcomes in patients with mantle cell lymphoma. *Blood* 2016; 127(12):1559–63. doi: 10.1182/blood-2015-10-673145.

70. Vidal-Crespo A, Rodriguez V, Matas-Cespedes A, Lee E, Rivas-Delgado A, Giné E et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor CC-292 shows activity in mantle cell lymphoma and synergizes with lenalidomide and NIK inhibitors depending on nuclear factor- κ B mutational status. *Haematologica* 2017; 102(11):e447-e451. doi: 10.3324/haematol.2017.168930.
71. Guan J, Huang D, Yakimchuk K, Okret S. p110 α Inhibition Overcomes Stromal Cell-Mediated Ibrutinib Resistance in Mantle Cell Lymphoma. *Mol Cancer Ther* 2018; 17(5):1090–100. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0784.
72. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248–54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
73. Jain P, Wang M. Mantle cell lymphoma: 2019 update on the diagnosis, pathogenesis, prognostication, and management. *Am J Hematol* 2019; 94(6):710–25. doi: 10.1002/ajh.25487.
74. Dreyling M, Aurer I, Cortelazzo S, Hermine O, Hess G, Jerkeman M et al. Treatment for patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma: European-based recommendations. *Leuk Lymphoma* 2018; 59(8):1814–28. doi: 10.1080/10428194.2017.1403602.
75. Merolle MI, Ahmed M, Nomie K, Wang ML. The B cell receptor signaling pathway in mantle cell lymphoma. *Oncotarget* 2018; 9(38):25332–41. doi: 10.18632/oncotarget.25011.
76. Smith A, Roman E, Appleton S, Howell D, Johnson R, Burton C et al. Impact of novel therapies for mantle cell lymphoma in the real world setting: a report from the UK's Haematological Malignancy Research Network (HMRN). *Br J Haematol* 2018; 181(2):215–28. doi: 10.1111/bjh.15170.
77. Jeon Y-W, Yoon S, Min GJ, Park S-S, Park S, Yoon J-H et al. Clinical outcomes for ibrutinib in relapsed or refractory mantle cell lymphoma in real-world experience. *Cancer Med* 2019; 8(16):6860–70. doi: 10.1002/cam4.2565.
78. Roecklein BA, Torok-Storb B. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. *Blood* 1995; 85(4):997–1005.
79. Graf L, Iwata M, Torok-Storb B. Gene expression profiling of the functionally distinct human bone marrow stromal cell lines HS-5 and HS-27a. *Blood* 2002; 100(4):1509–11. doi: 10.1182/blood-2002-03-0844.
80. Zhao X, Lwin T, Silva A, Shah B, Tao J, Fang B et al. Unification of de novo and acquired ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. *Nat Commun* 2017; 8:14920. doi: 10.1038/ncomms14920.

81. Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S, Pham TH-T, Fend F, Jaffe ES et al. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood* 2006; 108(5):1668–76. doi: 10.1182/blood-2006-04-015586.
82. Smith SM. Targeting mTOR in mantle cell lymphoma: current and future directions. *Best Pract Res Clin Haematol* 2012; 25(2):175–83. doi: 10.1016/j.beha.2012.04.008.
83. Arvidsson G, Henriksson J, Sander B, Wright AP. Mixed-species RNAseq analysis of human lymphoma cells adhering to mouse stromal cells identifies a core gene set that is also differentially expressed in the lymph node microenvironment of mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia patients. *Haematologica* 2018; 103(4):666–78. doi: 10.3324/haematol.2017.182048.
84. Lwin T, Crespo LA, Wu A, Dessureault S, Shu HB, Moscinski LC et al. Lymphoma cell adhesion-induced expression of B cell-activating factor of the TNF family in bone marrow stromal cells protects non-Hodgkin's B lymphoma cells from apoptosis. *Leukemia* 2009; 23(1):170–7. doi: 10.1038/leu.2008.266.
85. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(11):1978–86. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.03.010.
86. Maekawa T, Maniwa Y, Doi T. Expression and localization of FOXO1 in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2009; 22(01). doi: 10.3892/or_00000406.
87. Xie L, Ushmorov A, Leithäuser F, Guan H, Steidl C, Färbinger J et al. FOXO1 is a tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2012; 119(15):3503–11. doi: 10.1182/blood-2011-09-381905.
88. Obrador-Hevia A, Serra-Sitjar M, Rodríguez J, Villalonga P, Fernández de Mattos S. The tumour suppressor FOXO3 is a key regulator of mantle cell lymphoma proliferation and survival. *Br J Haematol* 2012; 156(3):334–45. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08951.x.
89. Wang J, Xu-Monette ZY, Jabbar KJ, Shen Q, Manyam GC, Tzankov A et al. AKT Hyperactivation and the Potential of AKT-Targeted Therapy in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Pathol* 2017; 187(8):1700–16. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.04.009.
90. Rivera-Soto R, Yu Y, Dittmer DP, Damania B. Combined Inhibition of Akt and mTOR Is Effective Against Non-Hodgkin Lymphomas. *Front Oncol* 2021; 11:670275. doi: 10.3389/fonc.2021.670275.
91. Chien AJ, Tripathy D, Albain KS, Symmans WF, Rugo HS, Melisko ME et al. MK-2206 and Standard Neoadjuvant Chemotherapy Improves Response in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive and/or Hormone Receptor-Negative Breast Cancers in the I-SPY 2 Trial. *J Clin Oncol* 2020; 38(10):1059–69. doi: 10.1200/JCO.19.01027.
92. Jonasch E, Hasanov E, Corn PG, Moss T, Shaw KR, Stovall S et al. A randomized phase 2 study of MK-2206 versus everolimus in refractory renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2017; 28(4):804–8. doi: 10.1093/annonc/mdw676.

93. Rauert-Wunderlich H, Rudelius M, Ott G, Rosenwald A. Targeting protein kinase C in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2016; 173(3):394–403. doi: 10.1111/bjh.13973.
94. Ma J, Lu P, Guo A, Cheng S, Zong H, Martin P et al. Characterization of ibrutinib-sensitive and -resistant mantle lymphoma cells. *Br J Haematol* 2014; 166(6):849–61. doi: 10.1111/bjh.12974.
95. Vann KR, Pal D, Smith AL, Sahar N-E, Krishnaiah M, El-Gamal D et al. Combinatorial inhibition of BTK, PI3K-AKT and BRD4-MYC as a strategy for treatment of mantle cell lymphoma. *Mol Biomed* 2022; 3(1):2. doi: 10.1186/s43556-021-00066-9.
96. Sarkozy C, Ribrag V. Novel agents for mantle cell lymphoma: molecular rational and clinical data. *Expert Opin Investig Drugs* 2020:1–11. doi: 10.1080/13543784.2020.1760245.
97. Li J, Wang X, Xie Y, Ying Z, Liu W, Ping L et al. The mTOR kinase inhibitor everolimus synergistically enhances the anti-tumor effect of the Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor PLS-123 on Mantle cell lymphoma. *Int J Cancer* 2018; 142(1):202–13. doi: 10.1002/ijc.31044.
98. Shen Y, Crassini K, Sandhu S, Fatima N, Christopherson RI, Mulligan SP et al. Dual inhibition of MEK1/2 and AKT by binimetinib and MK2206 induces apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells under conditions that mimic the tumor microenvironment. *Leuk Lymphoma* 2019; 60(7):1632–43. doi: 10.1080/10428194.2018.1542148.
99. Szydłowski M, Kiliszek P, Sewastianik T, Jabłonska E, Białopiotrowicz E, Gorniak P et al. FOXO1 activation is an effector of SYK and AKT inhibition in tonic BCR signal-dependent diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2016; 127(6):739–48. doi: 10.1182/blood-2015-06-654111.
100. Kapoor I, Li Y, Sharma A, Zhu H, Bodo J, Xu W et al. Resistance to BTK inhibition by ibrutinib can be overcome by preventing FOXO3a nuclear export and PI3K/AKT activation in B-cell lymphoid malignancies. *Cell Death Dis* 2019; 10(12):924. doi: 10.1038/s41419-019-2158-0.

8 Eidesstattliche Versicherung



Eidesstattliche Versicherung

Schwandner, Claudia

Name, Vorname

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

Einfluss der Tumormikroumgebung auf die BTK-Sensitivität des MCL

Rolle der Kombination aus dem BTK-Inhibitor CC-292 und dem AKT-Inhibitor MK-2206

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

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

München, 27.01.2025

Ort, Datum

C. Schwandner

Unterschrift Claudia Schwandner

Eidesstattliche Versicherung

Stand: 27.01.2025

9 Bisherige Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht im Rahmen von:

- 1) Deuß J, Mack N, Schwandner C, Zimmermann Y, Dreyling M, Silkestedt E, Influence of the tumor microenvironment on b-cell-receptor signal inhibitor in mantle cell lymphoma, 20. wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Klinikum der Universität München, Campus Großhadern, Herrsching, Juli 2018.
- 2) Schwandner C, Deuß J, Mack N, Zimmermann Y, Dreyling M, Silkenstedt E, Interaction of mantle cell lymphoma with the microenvironment induces pAKT-mediated resistance against BTK-inhibition and can be overcome by co-treatment with MK-2206, 21. wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Klinikum der Universität München, Campus Großhadern, Herrsching, Juli 2019.
- 3) Silkenstedt E, Schwandner C, Deuss J, Mack N, Zimmermann Y, Dreyling M. Interaction of mantle cell lymphoma with the microenvironment induces phospho Akt-mediated resistance against BTK inhibition and can be overcome by co-treatment with a specific akt inhibitor (MK-2206). Blood 2019; 134(Supplement_1):2802. doi: 10.1182/blood-2019-128782

10 Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich die letzten Zeilen nutzen, um all den Menschen herzlich zu danken, die mich auf dem langen Weg bis zur Fertigstellung meiner Dissertation begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Martin Dreyling für die Möglichkeit dieses spannende Thema im Rahmen einer Dissertation zu erforschen und für die ausgezeichnete Betreuung. Sowie Dr. med. Elisabeth Silkenstedt für die stets verfügbare Unterstützung, hervorragende und geduldige Betreuung und Korrektur meiner Arbeit.

Ich danke Yvonne Zimmermann für die praktische Einarbeitung, die Tipps und Tricks und vor allem auch die unterstützende Zusammenarbeit im Labor. Ebenso möchte ich auch der gesamten Forschungsgruppe des ELLF's meinen Dank für die freundschaftliche und motivierende Atmosphäre im Labor aussprechen.

Zuletzt möchte ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben, meiner Familie und meinen Freunden meinen tiefsten Dank aussprechen. Insbesondere Danke an meine Eltern und meinen Bruder. Für Ihre liebevolle und unablässige Unterstützung nicht nur während meines gesamten Studiums, sondern an jedem Tag.