

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III – Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

**Molekulare Therapie des Mantelzelllymphoms -
In Vitro Wirksamkeit des Proteasom-Inhibitors Bortezomib
in Mono- und Kombinationstherapie**

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

vorgelegt von
Malte Rieken
aus
Eggenfelden

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Dreyling

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Kai Hell
Priv.-Doz. Dr. Dr. Fuat Oduncu

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Oliver Weigert

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2010

Die Ergebnisse dieser Arbeit - oder Teile hiervon - wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Weigert, O., Pastore, A., Rieken, M., Lang, N., Hiddemann, W., Dreyling, M. (2007).
“Sequence-dependent synergy of the proteasome inhibitor bortezomib and cytarabine in mantle cell lymphoma.” *Leukemia* 21(3): 524-528.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Das Mantelzelllymphom	1
1.1.1	Die Pathogenese des Mantelzelllymphoms	1
1.1.2	Klinik, Verlauf und Therapie des Mantelzelllymphoms	6
1.2.	Das Proteasom	9
1.2.1	Bau und Funktion des Proteasoms	9
1.3	Proteasom-Inhibitoren – Bortezomib	12
1.3.1	Entwicklung, Struktur und Funktionsweise von Bortezomib	12
1.3.2	Antineoplastische Wirksamkeit von Bortezomib <i>in vitro</i>	14
1.3.3	Bortezomib in der Therapie bösartiger hämatologischer Erkrankungen	17
2	Material und Methoden	20
2.1	Methoden der Zellkultur	20
2.1.1	Verwendete Zelllinien – Charakterisierung	20
2.1.2	Zellkulturbedingungen	20
2.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	21
2.1.4	Bestimmung der Viabilität und Proliferation von Zellen mittels Trypanblau-Ausschluß-Test	21
2.1.5	WST-1 Zell-Proliferationsassay	22
2.1.6	Bestimmung von kombinatorischen Indizes nach Chou und Talalay	23
2.1.7	Apoptose Detektion mit Annexin V-PE und 7-AAD Färbung	24
2.1.8	Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid Färbung	26
2.2	Material	27
2.2.1	Chemikalien und Enzyme	27
2.2.2	Lösungen und Puffer	27
2.2.3	Verwendete Inhibitoren und Zytostatika	27
2.2.4	Verwendete Softwareprogramme	28
2.2.5	Verwendete Geräte	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Proliferationshemmung durch Bortezomib	29
3.1.1	Bortezomib führt in 72-Stunden Langzeitexposition zu Dosis- und Zeit-abhängiger Proliferationshemmung in Zelllinien	29
3.1.2	Die IC ₅₀ -Werte für 24 Stunden Exposition mit Bortezomib unterscheiden sich deutlich innerhalb der Mantelzelllymphom- und Kontrollzelllinien	32
3.2	Induktion von Apoptose durch Bortezomib	34
3.2.1	Bortezomib induziert im 24-Stunden Versuch Apoptose in Mantelzell-lymphom-Zelllinien	34
3.2.2	Die Empfindlichkeit für Bortezomib ist nicht Mantelzelllymphom-spezifisch	37
3.3	Auswirkungen von Bortezomib auf den Zellzyklus	37
3.3.1	Veränderungen im Zellzyklusprofil sind ein frühes Ereignis nach Exposition mit Bortezomib	37
3.4	Kombination von Bortezomib mit konventionellen Chemotherapeutika	41
3.4.1	Antiproliferative Wirksamkeit konventioneller Chemotherapeutika	41

Inhaltsverzeichnis

3.4.2	Die Kombination aus Bortezomib und Cytosin-Arabinosid zeigt Synergismus bei Präinkubation mit Cytosin-Arabinosid	43
3.4.3	Überwiegend additive oder antagonistische Effekte bei der Kombination aus Bortezomib mit Fludarabin, Gemcitabin oder Mitoxantron	44
4	Diskussion	46
4.1	Bortezomib zeigt hohe Wirksamkeit gegen Mantelzelllymphom Zelllinien	46
4.2	Die Kombination von Bortezomib mit anderen Substanzen könnte eine neue therapeutische Option darstellen	57
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	63
7	Lebenslauf	84
8	Danksagung	87

1. Einführung

1.1 Das Mantelzelllymphom

1.1.1 Die Pathogenese des Mantelzelllymphoms

Das Mantelzelllymphom (MCL) ist ein niedrigmalignes B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom, das in der aktuellen WHO Lymphom Klassifikation als eigene Lymphomentität angesehen wird. Es macht etwa 5-10% aller Lymphome aus und ist vor allem durch die schlechteste Prognose aller Lymphome mit einem medianen Überleben von 3 Jahren und nur 10-15% Langzeitüberlebenden charakterisiert (Lenz et al., 2004).

In den letzten Jahren konnten viele neue Erkenntnisse über die Biologie des MCL erlangt werden, welche das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen gesteigert haben und somit auch zur Etablierung neuer Therapieansätze geführt haben. Beim MCL lassen sich zwei verschiedene zytologische Varianten unterscheiden. Einerseits der klassische Subtyp, der durch die monotone Proliferation von kleinen bis mittelgroßen zytoplasmaarmen Lymphozyten mit irregulären Kernen und unscheinbaren Nucleoli geprägt ist. Andererseits die blastoide Variante, die einen klinisch aggressiveren Verlauf zeigt und Tumoren beinhaltet, die Lymphoblasten ähneln sowie große und pleomorphe Zellen, die morphologisch großzelligen Lymphomen gleichen (Campo et al., 1999). Überlappende morphologische Charakteristika zwischen diesen beiden Varianten sind bekannt, so dass diese eher als Endpunkte des möglichen morphologischen Spektrums angesehen werden sollten (Tiemann et al., 2005).

Die Tumorzellen des MCL zeigen den Phänotyp reifer B-Zellen mit Oberflächenexpression von IgM und IgG, desweiteren sind die Zellen positiv für die Marker CD5, CD20, CD22, CD24, CD43, CD79a und HLA-DR, während CD23 und die Follikelzentrumsmarker CD10 und bcl-6 gewöhnlich negativ sind (Bertoni et al., 2004; Salaverria et al., 2006). Phänotypische Varianten können eine Negativität für CD5 und die gelegentliche Expression von CD10, bcl-6 oder T-Zell Markern CD8 oder CD7 aufweisen (Campo et al., 1999; Swerdlow et al., 2002). Das genetische Kennzeichen des MCL ist die chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32), die in

Einführung

praktisch allen MCL Fällen detektiert werden kann (Campo et al., 1999). Methode der Wahl zur Detektion dieser Translokation ist die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Die genetische Alteration führt zur Dysregulierung und Überexpression von Cyclin D1, das eine wichtige Rolle in der Steuerung des Zellzyklus spielt (Hunter et al., 1994). Zudem sind eine Reihe weiterer genetischer Alterationen bekannt, die beim MCL von Bedeutung sind, und auf die an späterer Stelle noch genauer eingegangen wird. Alle bisher in der Literatur beschriebenen molekularen Veränderungen beim MCL scheinen entweder die Zellzyklusregulation zu stören oder die zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung zu beeinflussen (Fernandez et al., 2005). Wie oben bereits erwähnt ist die chromosomale Translokation t(11;14) (q13;q32) das genetische Kennzeichen des MCL. Diese Alteration führt zur Ankopplung des Promotors die für die schwere Kette der Immunglobuline auf Chromosom 14 mit dem *bcl-1* (B-cell lymphoma/leukemia 1) Gen auf 11q13 (Tsujimoto et al., 1984) sowie *CCDN1*, das für *Cyclin D1* codiert. Durch die Translokation wird *bcl-1* unter die Kontrolle des IgH-Enhancers gestellt (Abb. 1) , was zu einer Überexpression von *Cyclin D1* führt.

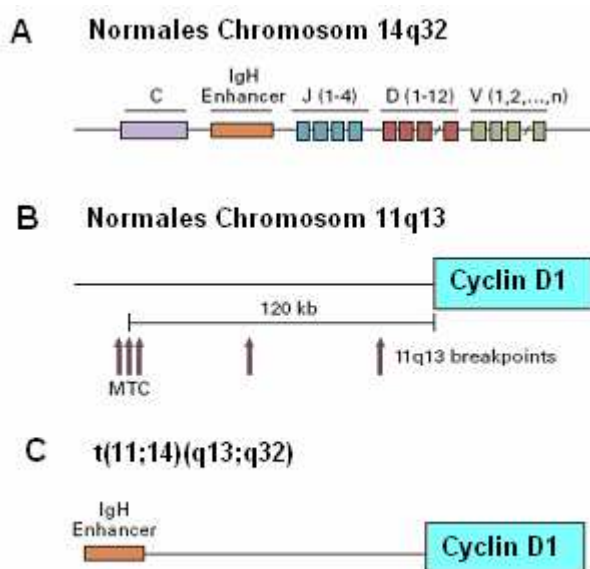


Abbildung 1: Translokation t(11;14)(q13;q32) in MCL

(A) Normaler IgH-Locus auf 14q32.
(B) Struktur des *Cyclin D1* auf 11q13. Die meisten Bruchstellen sind im Bereich des Major Translocation Cluster (MTC) lokalisiert. Zehn bis 20% der MCL-Fälle weisen Bruchpunkte in weiter distal gelegenen Regionen auf.
(C) Als Ergebnis der t(11;14) Translokation gerät *Cyclin D1* unter die Kontrolle des IgH-Enhancers. (modifiziert nach Fernandez et al., 2005)

Cyclin D1 ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus, der zusammen mit den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) 4 und 6 den Übergang des Zellzyklus von der G₁- zur S-Phase durch die Phosphorylierung des Retinoblastom Proteins (pRb) kontrolliert. Eine erhöhte Cyclin D1-Expression in MCL beschleunigt den Übergang der G₁- in die S-Phase und die Proliferation der Tumorzellen durch zwei Mechanismen: Zum einen führt ein Anstieg der intrazellulären Konzentration von Cyclin D1/CDK-Komplexen zur

Einführung

Phosphorylierung des pRb, wodurch pRb seine hemmende Wirkung auf den Zellzyklus verliert (Hunter et al., 1994; Sherr 1996). Zum zweiten können erhöhte Mengen an Cyclin D1/CDK-Komplexen die Bindung der CDK Inhibitoren p27^{KIP} und p21 an Cyclin E/CDK2 verhindern. Auch Cyclin E und CDK2 fördern den Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus durch die Phosphorylierung von pRb (Bertoni et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass p27^{KIP} in MCL Zellen vor allem durch Cyclin D1/CDK-Komplexe inhibiert wird, desweiteren führt eine gesteigerter Abbau durch den Ubiquitin-Proteasom-Pathway zur Verringerung dieses wichtigen CDK-Inhibitors (Chiarle et al., 2000).

Obwohl die *Cyclin D1*-Überexpression, bedingt durch die Translokation t(11;14) (q13;q32), das genetische Kennzeichen des MCL ist, sind in der Literatur Fälle von Cyclin D1-negativen MCL veröffentlicht, bei denen mittels FISH auch keine Translokation t(11;14) (q13;q32) nachweisbar war. Diese Cyclin D1-negativen Fälle zeigten im Vergleich zu Cyclin D1-positiven MCL jedoch den gleichen klinischen Verlauf und ein für MCL charakteristisches Genexpressionsprofil in der Mikroarray Analyse. Zudem konnte in diesen Fällen als alternativer Mechanismus eine Hochregulation von *Cyclin D2* und *D3* detektiert werden (Fu et al., 2005).

Zusätzlich zu oben genannten Mechanismen existieren in MCL weitere Alterationen, die zu einer Störung der Zellzyklusregulation beitragen. So konnte in einem Teil von besonders aggressiven MCL-Fällen eine homozygote Deletion des CDK-Inhibitors *p16^{INK4a}* auf Chromosom 9p21 detektiert werden (Dreyling et al., 1997; Pinyol et al., 1997). *p16^{INK4a}* inhibiert CDK 4 und CDK 6 und führt daher dazu, dass pRb in unphosphoryliertem und aktiven (antiproliferativem) Zustand bleibt. Die Deletion von *p16^{INK4a}* und Überexpression von *Cyclin D1* beschleunigen daher durch Erhöhung von aktiven Cyclin D1/CDK Komplexen den Übergang von der G₁- in die S-Phase (Fernandez et al., 2005). In einem Teil der MCL-Fälle mit *p16^{INK4a}*-Wildtyp zeigte sich eine Genamplifikation und hohe Expression von *BMI-1*. *BMI-1* hemmt die Transkription von *p16^{INK4a}* und fördert somit den Übergang von der G₁- in die S-Phase. Obwohl Alterationen im *BMI-1* Gen kein häufiges Ereignis in MCL sind, scheinen sie für die Pathogenese von besonders aggressiven MCL Fällen von Bedeutung sein (Bea et al., 2003). Neben *p16^{INK4a}* codiert die genomische Region *INK4a/ARF* auch für ein weiteres Transkript, *p14^{ARF}*. Durch Verhinderung der MDM2-vermittelten proteasomalen Degradation des p53-Proteins besitzt *p14^{ARF}* eine wichtige Funktion in der Regulation von Signaltransduktionswegen der Zellzyklus-

Einführung

und Apoptoseregulation (Harris et al., 2005). Nachdem beim MCL, wie auch in anderen B-Zell Lymphomen Deletionen des *INK4a/ARF*-Genorts sowohl das *p16^{INK4a}*- als auch das *p14^{ARF}*-Gen betreffen, führt eine Inaktivierung zu einer gleichzeitigen Hemmung der Zellzyklusregulation und des p53-Signaltransduktionswegs. Eine weitere, in der Literatur beschriebene genetische Veränderung, die in besonders aggressiven, blastoiden Variante des MCL detektiert werden konnte ist die Amplifikation des CDK4-Gens, die zu einer Überexpression von CDK4 mRNA und Protein führt (Hernandez et al., 2005). Abbildung 2 fasst die bisher beschriebenen pathogenetischen Mechanismen nochmals zusammen.

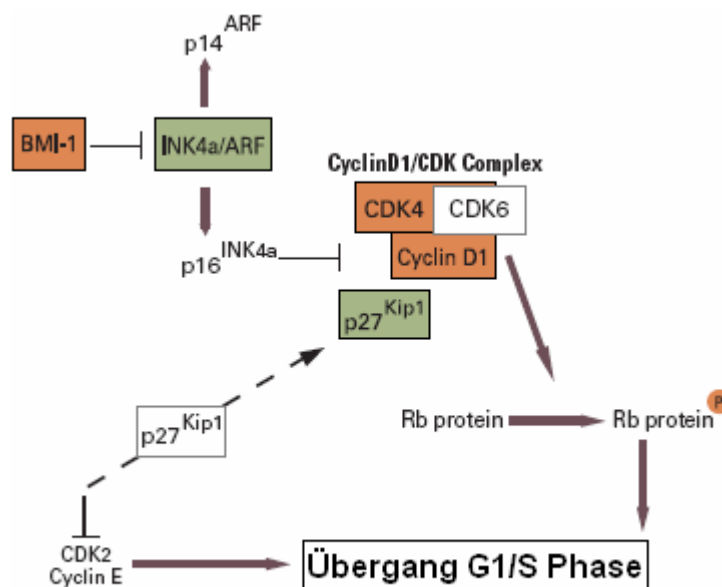


Abbildung 2: Zellzyklusdysregulation in MCL

Moleküle mit gesteigerter Funktion oder Expression sind orange markiert, Moleküle mit geminderter Funktion oder Expression sind grün markiert. (modifiziert nach Fernandez et al., 2005)

Der zweite pathogenetische Hauptmechanismus im MCL neben der oben beschriebenen Zellzyklusdysregulation ist eine fehlerhafte Funktion des DNA-Reparaturmechanismus. Eine der am häufigsten beim MCL beobachteten genetischen Alterationen sind Deletionen in der chromosomalen Region 11q22-23, in der das Ataxia-Teleangiectasia Mutated (*ATM*) Gen lokalisiert ist (Stilgenbauer et al., 1999; Schaffner, 2000). *ATM* codiert für eine Phosphoproteinkinase der PI-3 Kinase-Familie und spielt eine zentrale Rolle in der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung (Zhou et al., 2000). *ATM* ist nach DNA-Schädigung für die Aktivierung zahlreicher Schlüsselproteine wie p53, MDM2, BRCA1, CHK2 und NBS1 verantwortlich (Zhou et

Einführung

al., 2000) . Die Folge dieser Aktivierung nach DNA-Schädigung sind ein G₁- oder ein G₂-Arrest sowie eine verminderte DNA-Synthese. Auch die dem *ATM*-Gen in der Signaltransduktionskaskade nachgeordneten Regulatoren können genetische Alterationen aufweisen und somit zur Pathogenese des MCL beitragen. CHK1 und CHK2 sind Kinasen, die nach DNA-Schädigung eine DNA-Replikation verhindern und einen Arrest des Zellzyklus induzieren (Zhou et al., 2000). In einem Teil von MCL-Fällen konnten Alterationen des CHK2-Gens festgestellt werden, in seltenen Fällen auch ein verminderter Gehalt an CHK1-Protein (Hangaishi et al., 2002; Tort et al., 2005).

Auch *p53* ist Ziel genetischer Alterationen beim MCL. *p53* nimmt eine Schlüsselfunktion in der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung ein. Die Tumorsuppressorfunktion von *p53* wird durch eine Vielzahl an Mechanismen vermittelt, die zu Zellzyklusarrest, Induktion von Apoptose, Verhinderung von Angiogenese und Metastasierung und zur Initiierung der DNA-Reparatur führen (Harris et al., 2005). Während eine Inaktivierung von *p53* nur selten in klassischen MCL Fällen beobachtet werden, zeigt diese sich in 30% der blastoiden Varianten mit hohen Proliferationsraten und ist mit einer schlechten Prognose verbunden (Fernandez et al., 2005).

Neben den bereits erwähnten Mechanismen werden weitere pathogenetische Prinzipien des MCL diskutiert. So scheint der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine wichtige Rolle zu spielen. NF- κ B ist normalerweise im Cytoplasma an I κ B gebunden und somit inaktiv. Durch eine Vielzahl von Stimuli wird I κ B durch die IK-Kinase phosphoryliert, ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut. Dadurch wird NF- κ B frei und in den Zellkern lokalisiert, wo es seine Zielgene aktiviert. Die Zielgene von NF- κ B sind zum einen Entzündungsmediatoren, Angiogenesemediatoren, Adhäsionsmoleküle und Cytokine, zudem werden jedoch auch anti-apoptotische und proliferationssteigernde Effekte durch NF- κ B vermittelt (Nakanishi et al., 2005). Eine konstitutive Überexpression von *NF- κ B* konnte sowohl in MCL-Zelllinien als auch in primären MCL-Zellen nachgewiesen werden, die Inhibition der konstitutiven NF- κ B Aktivierung führte zu Zellzyklusarrest und Apoptose (Pham et al., 2003). Diese Daten legen somit nahe, dass auch die dauerhafte Aktivierung von NF- κ B zur Pathogenese des MCL beiträgt.

Ein anderer, erst unlängst beschriebener möglicher Pathomechanismus könnte den PI3 Kinase/Akt-Signaltransduktionsweg betreffen. Nach Phosphorylierung durch die

Einführung

PI3 Kinase und somit Aktivierung des Akt-Proteines werden sowohl die Proliferation der Zellen gesteigert, als auch Apoptose verhindert (Osaki et al., 2004). Phosphoryliertes Akt konnte in einer Arbeit von Rudelius et al. in 12 von 12 blastoiden MCL-Varianten sowie in 4 von 4 Zelllinien detektiert werden, während phosphoryliertes Akt nur in 5 von 16 typischen MCL Fällen nachweisbar war. Eine Hemmung des PI3K/Akt-Signaltransduktionswegs führte zu Zellzyklusarrest und induzierte Apoptose, sodass auch die konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt Signaltransduktionswegs zur Pathogenese des MCL beiträgt (Rudelius et al., 2006).

1.1.2 Klinik, Verlauf und Therapie des Mantelzelllymphoms

Das MCL zeigt eine Inzidenz von 2-3/100000/Jahr und macht etwa 5 bis 10% aller Lymphome in Nordamerika und Europa aus (Lenz et al., 2004). Mit einem Altersmedian von 65 Jahren bei Erstdiagnose betrifft es vor allem ältere männliche Patienten. Ein Großteil der MCL-Fälle wird erst in den fortgeschrittenen Ann Arbor-Stadien III und IV diagnostiziert (Bosch et al., 1998). Extranodale Verläufe werden in etwa 90% aller Fälle gefunden und betreffen vor allem Knochenmark, Leber und den Gastrointestinaltrakt. Eine B-Symptomatik wird in weniger als 50% beschrieben (Lenz et al., 2004).

Der klinische Verlauf des Mantelzelllymphoms ist durch eine schlechte Prognose mit einem mittleren Überleben von 3 bis 4 Jahren und nur 10 bis 15% Langzeitüberlebenden charakterisiert. Wichtige Prognosefaktoren sind schlechter Allgemeinzustand, B-Symptomatik, Splenomegalie und ein hoher IPI (International Prognostic Index)-Wert (Bosch et al., 1998). Desweiteren sind p53-Mutationen mit einer schlechten Prognose verbunden (Fernandez et al., 2005). In einer Studie, die Histopathologie, Zellproliferation und klinischen Verlauf an 304 MCL-Patienten untersuchte, zeigten sich in der multivariaten Datenanalyse Ki67-Index, mitotischer Index und Alter als statistisch signifikante Prognosefaktoren (Tiemann et al., 2005). Die große prognostische Bedeutung von Markern der Zellproliferation konnte in einer Mikroarray-Studie bestätigt werden (Rosenwald et al., 2003).

Obwohl im Verständnis der Pathogenese in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt werden konnten, bleibt die Therapie des MCL schwierig. Der klinische Verlauf ist durch eine hohe initiale Gesamtansprechrates, einen relativ kurzen Zeitraum bis

Einführung

zum Krankheitsprogress sowie schlechtes Gesamtüberleben (OS) von nur 3 bis 4 Jahren gekennzeichnet (Witzig et al., 2005). Bisher gibt es kein Standardtherapiekonzept für neu diagnostizierte oder rezidierte MCL. Im Allgemeinen zeigen aggressivere Konzepte hohe Ansprechraten und verbessern das progressionsfreie Überleben (PFS), dennoch ist das MCL durch keine der bisher bekannten Therapien heilbar (Brody et al., 2006).

Als initiale Therapie wird eine Kombinationschemotherapie durchgeführt. Die Chemotherapie-Regime lassen sich in 3 große Gruppen einteilen: Schemata die Doxorubicin enthalten wie CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison), intensivierte Kombinationschemotherapie wie HyperVAD (Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin, Dexamethason, Cytarabin und Methotrexat), und auf Purin-Analoga basierende Schemata wie FCM (Fludarabin, Cyclophosphamid und Mitoxantron) (Witzig et al., 2005).

Durch Hinzunahme des anti-CD20 Antikörpers Rituximab konnte in klinischen Studien eine Verbesserung der Ansprechrate (OR) erzielt werden. So führte R-CHOP im Vergleich zu CHOP in einer prospektiven, randomisierten Studie unbehandelter Patienten im fortgeschrittenen Stadium zu signifikant höherem OR (94% vs. 74%, $p=0,005$) und kompletten Remission (CR) (34% vs. 7%, $p=0,00024$), dennoch konnte das PFS und das OS nicht signifikant verbessert werden (Lenz et al., 2005).

In einer weiteren Studie an Patienten mit therapierefraktärem oder rezidivierendem MCL zeigte sich im R-FCM Arm im Vergleich zum FCM Arm beim MCL ein statistisch signifikant längeres OS ($p=0,0042$) (Forstpointner et al., 2004).

Eine weitere therapeutische Option beim MCL besteht in der Stammzelltransplantation (SCT). Sowohl autologe als auch allogene SCT wurden in klinischen Studien auf ihren Einfluss auf PFS und OS untersucht. 2005 wurden die Ergebnisse der ersten prospektiven, randomisierten Studie vorgestellt, in der myoablative Radio-Chemotherapie und autologe SCT mit einer α -Interferon Erhaltungstherapie in 122 Patienten verglichen wurde. Verglichen mit dem α -Interferon-Arm zeigten Patienten im SCT-Arm ein signifikant längeres PFS (39 Monate vs. 17 Monate, $p=0,018$), jedoch keinen signifikanten Unterschied im 3-Jahres OS (83% vs. 77%, $p=0,18$) (Dreyling et al., 2005). Ergebnisse weiterer Studien legen nahe, dass der Nutzen einer autologen SCT größer ist, wenn sie früher im Krankheitsverlauf durchgeführt wird. Eine retrospektive Studie, die das

Einführung

Ergebnis von 195-MCL Patienten nach autologer SCT untersuchte, berichtet über ein OS von 76% nach 2 Jahren beziehungsweise 50% nach 5 Jahren mit einem PFS von 55% bzw. 33%. Der Krankheitsstatus bei Transplantation war der wichtigste Prognosefaktor hinsichtlich des Überlebens der Patienten: Patienten mit chemotherapieempfindlicher Erkrankung, die sich jedoch nicht in erster kompletter Remission befanden, hatten eine 3 mal (95% CI: 1,66-5,38, $P < 0,001$) höhere Wahrscheinlichkeit zu versterben als Patienten, die in erster kompletter Remission transplantiert wurden (Vandenberghe et al., 2003). Die Frage, ob die Hinzunahme von Rituximab in die Induktion zu einer Verbesserung der Langzeitprognose führt ist Gegenstand aktueller Studien.

Obwohl mit der autologen SCT eine Verlängerung des PFS erreicht wird, konnte bisher nicht nachgewiesen werden, dass eine definitive Heilung erzielt werden kann. Da die allogene SCT in anderen Lymphomtypen einen kurativen Ansatz aufgrund des Graft-versus-Leukemia Effekts gezeigt hat (Peggs et al., 2005), wurde dieser Ansatz auch für therapierefraktäre MCL Patienten verfolgt. Mit einer myeloablativen Therapie gefolgt von einer allogenen SCT konnte in einer Studie an 16 MCL Patienten nach 3 Jahren ein OS von 55% erreicht werden, wobei die therapiebezogene Mortalität bei 38% lag (Khoury et al., 1999). Da das MCL vorwiegend bei älteren Patienten auftritt, wurden auch dosis-reduzierte Konditionierungen, gefolgt von allogener SCT geprüft. Die Ergebnisse der einzelnen Studien unterscheiden sich stark, sodass eine endgültige Bewertung noch aussteht. So konnte in einer Studie an 18 chemotherapie-sensitiven MCL-Patienten eine 3 Jahresüberlebensrate von 85,5% und ein PFS von 82% ermittelt werden (Khoury et al., 2002), während in einer anderen Studie mit 22 chemotherapie-refraktären Patienten das 2 Jahresgesamtüberleben bei 12% lag und alle Patienten rezidierten (Robinson et al., 2002).

Ein weiterer Therapieansatz ist die Radioimmuntherapie. Die beiden klinisch zur Verfügung stehenden Substanzen sind hierbei Iod ¹³¹ -Tositumomab (Bexxar®) und Yttrium ⁹⁰ -Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin®). In einer Studie, in der MCL-Patienten im Rahmen einer Hochdosischemotherapie eine Radioimmuntherapie (Bexxar®) erhielten, lag das 3-Jahres Gesamtüberleben bei 93% und das PFS bei 61% (Gopal et al., 2002), vergleichbare Ergebnisse lieferte eine andere Studie, in der die Gabe von Zevalin® im Rahmen einer Hochdosischemotherapie gefolgt von autologer SCT untersucht wurde (Nademanee et al., 2005).

Einführung

Auch die klinische Wirksamkeit neuer Substanzen wird untersucht. In Studien sind derzeit unter anderem Proteasom-Inhibitoren, auf die im nächsten Kapitel noch ausführlich eingegangen wird, Thalidomid und „Mammalian Target of Rapamycin“ (mTOR) Kinase-Inhibitoren und Cyclin D1-Inhibitoren im Einsatz. Die Kombination von Thalidomid und Rituximab führte in einer Studie an Patienten mit therapierefraktärem MCL in 31% zu einer kompletten Remission sowie einem medianen PFS von 20 Monaten (95% CI, 17,3-23,6) und einem 3-Jahres-Überleben von 75% (Kaufmann et al., 2004). Die Wirksamkeit des mTOR Kinase-Inhibitors Temsirolimus wurde in einer Phase-II-Studie an Patienten mit therapierefraktärem MCL untersucht. Das Gesamtansprechen lag bei 38%, die Rate der kompletten Remissionen bei 3% und die mediane Zeit bis zum Progress bei 6,5 Monaten (95% CI, 2,9-8,3) (Witzig et al., 2005). Auch der Ansatz der gezielten Inhibition von Cyclin D1 wird in Studien verfolgt.

Zusammenfassend wurden in der Therapie des MCL in den letzten Jahren zwar Fortschritte erzielt und die Ansprechraten gesteigert, bezüglich des Gesamtüberlebens konnten jedoch keine wesentlichen Verbesserungen erreicht werden. Die SCT weist vielversprechende Ergebnisse auf, der Einfluß auf das Gesamtüberleben muß nach längerer Nachbeobachtungszeit bestätigt werden. Auch die neueren Substanzen bedürfen weiterer Untersuchungen, um ihren Stellenwert in der Therapie des MCL definieren zu können.

1.2 Das Proteasom

1.2.1 Bau und Funktion des Proteasoms

Das Proteasom ist ein Enzymkomplex, der sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma aller eukaryotischen Zellen vorkommt. Es ist das wichtigste extralysosomale, proteolytische System (Orlowski et al., 2000). Das Proteasom ist ein hochselektiver Enzymkomplex, dessen Regulation einen schnellen Abbau von Zielproteinen sicherstellt. Die Substrate des Proteasoms sind in Zellzyklusprogression, Onkogenese, Apoptose, Regulation von Genexpression, Entzündungsmechanismen und Langzeitgedächtnis involviert (Kisselev et al., 2001).

Einführung

Das Proteasom ist ein 2,4-MDa Komplex, der aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist, der 20S Kerneinheit (core particle, CP), die die Proteasen enthält, und einer 19S Regulationseinheit (regulatory particle, RP), die die 20S CP reguliert (Abb. 3) (Glickman et al., 2002). Die 20S CP ist zylinderförmig aus vier horizontal angeordneten Ringsystemen aufgebaut. Von diesen vier Ringen befinden sich zwei identische α -Ringe an den Außenseiten sowie zwei identische β -Ringe im Inneren (Richardson et al., 2005). Jeder dieser Ringe ist wiederum aus sieben Untereinheiten aufgebaut. Die zwei inneren β -Ringe enthalten die enzymatisch aktiven Bereiche des Proteasoms. Drei ($\beta 1, \beta 2$ und $\beta 5$) der sieben β -Untereinheiten sind für die enzymatische Aktivität des Proteasoms verantwortlich. Diese katalytisch aktiven Bereiche werden nach Enzymen ähnlicher proteolytischer Aktivität und Spezifität als Chymotrypsin-ähnlich, Trypsin-ähnlich oder Post-Glutamyl-Peptid Hydrolase-ähnlich bezeichnet (Adams, 2004).

In vivo ist die Bindung des 20S Proteasoms an eine regulatorische Einheit notwendig. Einer dieser Regulatoren ist das 19S RP, das den Eintritt von Substraten in den proteolytischen Kern kontrolliert (Glickman et al., 2002). Das 19S RP ist ein 700-kDa Komplex aus 20 Polypeptid Untereinheiten, das an beide Enden des 20S CP bindet um so das 26S Proteasom zu bilden. Das 19S RP kann weiterhin in zwei Unterstrukturen unterteilt werden, die Basis und die Deckelplatte (Glickman et al., 1998). Die Basis enthält sechs homologe ATPasen (Rpt 1-6) die Substrate entfalten und diese der Öffnung des 20S CP zuführen können, sowie drei Nicht-ATPase Untereinheiten (Rpn1, -2 und -10) (Glickman et al., 2002; Richardson et al., 2005). Die Basis allein ist in der Lage, Peptide und nicht-ubiquitinierte Proteine abzubauen, die Deckelplatte wird jedoch benötigt, um ubiquitinierte Proteine zu degradieren, und trägt somit zu einer höheren Spezifität der Proteolyse bei (Adams, 2004). Das 26S Proteasom katalysiert den Ubiquitin-Signalpfad der ATP-abhängigen Proteolyse. ATP wird hierbei sowohl für die Bildung des 26S Komplexes als auch für das Entfalten und Linearisieren großer Proteine benötigt, um deren Eintritt in den katalytischen inneren Kern des Proteasoms zu erleichtern (De Martino et al., 1999; Benaroudj et al., 2003).

Einführung

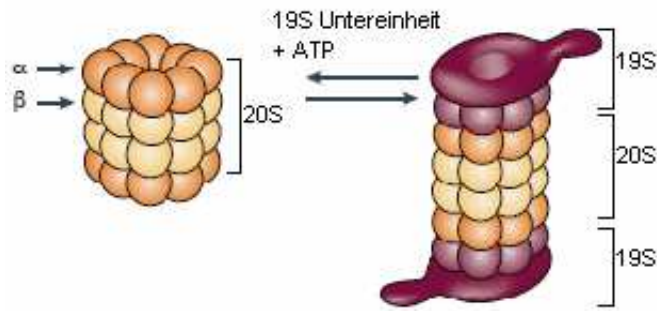


Abbildung 3: Struktur des 26S Proteasoms

Dreidimensionale Darstellung des Proteasom Multienzym Komplexes. Dieser besteht aus dem 20S Komplex, der sich aus α - und β -Untereinheiten zusammensetzt sowie zwei 19S Komplexen. Unter ATP Verbrauch bilden diese das Proteasom (modifiziert nach Adams, 2004)

Zielproteine des Proteasoms werden durch Anfügen einer Ubiquitinkette, einem aus 76 Aminosäuren bestehenden Polypeptid erkannt und somit dem Abbau zugeführt (Glickman et al., 2002). Die Ubiquitinierung von Substratproteinen beinhaltet die sequenzielle Wirkung von drei Enzymgruppen, die für die Aktivierung von freiem Ubiquitin und dessen Transport zu den Zielproteinen verantwortlich sind. Diese Enzymkaskade besteht aus einem ATP-abhängigem ubiquitin-aktivierendem Enzym (E1), etwa 25 verschiedenen ubiquitin-konjugierendem Enzymen (E2) und hunderten von Ubiquitin Protein Ligasen (E3) (Adams, 2004). Durch die Enzymkaskade wird eine kovalente Bindung zwischen dem C-Terminus der Ubiquitinkette und einer freien Aminogruppe des Zielproteins hergestellt (Richardson et al., 2005).

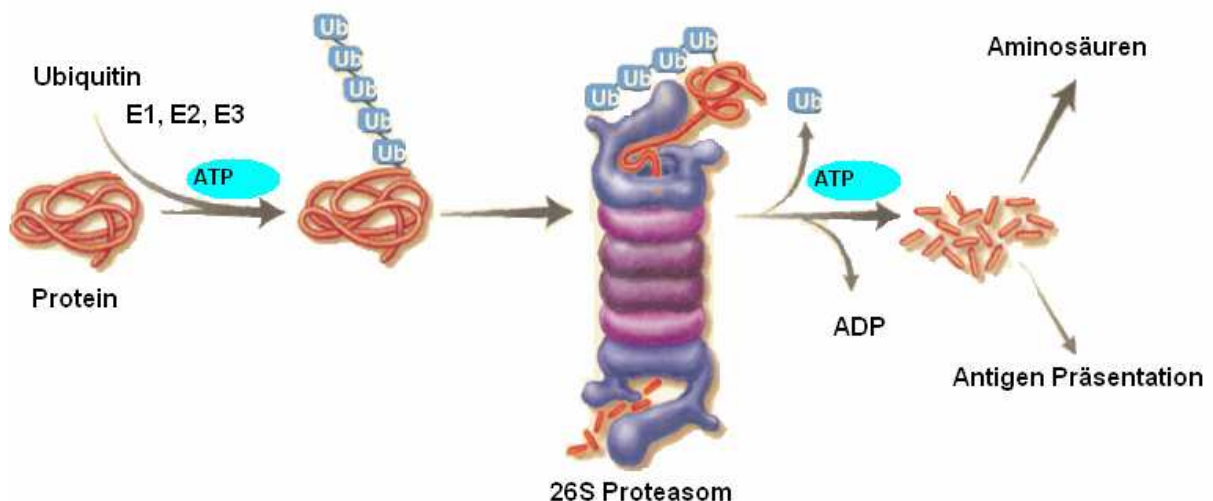


Abbildung 4: Vereinfachtes Schema des Ubiquitin-Proteasom Pathways

Das Zielprotein wird durch die Enzyme E1, E2 und E3 unter ATP-Verbrauch ubiquitiniert und somit für den Abbau im Proteasom gekennzeichnet (modifiziert nach Kisselev et al., 2001).

1.3 Proteasom-Inhibitoren - Bortezomib

1.3.1 Entwicklung, Struktur und Funktionsweise von Bortezomib

Die Proteinhomöostase ist entscheidend für biologische Prozesse, die für den Fortbestand von Tumorzellen von großer Bedeutung sind. Daher ist die Regulation von Bildung und Abbau von Proteinen, die Proliferation oder andere Eigenschaften von Tumorzellen vermitteln, ein wichtiger Angriffspunkt für die Therapie maligner Tumoren. Das Ubiquitin-Proteasom-System, das mehr als 80% aller zellulären Proteine prozessiert ist der Hauptmechanismus für den Abbau von Proteinen, die für die Kontrolle von Zellzyklus, Apoptose oder Zelladhäsion verantwortlich sind (Adams, 2004). Daher entwickelte sich das Proteasom zu einem Erfolg versprechenden Angriffsziel für die Therapie maligner Tumoren.

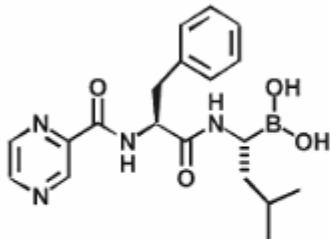
Die wichtigsten Proteasom-Inhibitoren lassen sich entsprechend der chemischen Gruppen, die mit dem Threoninrest der aktiven Zone des Proteasoms reagiert, in fünf verschiedene Gruppen einteilen: Peptid-Aldehyde, Peptid-Vinylsulfone, Peptid-Boronate, Peptid-Epoxyketone und β -Lactone (Kisselev et al., 2001). Einzig die Peptid-Boronate zeigten Eigenschaften, die sie für eine klinische Fortentwicklung als geeignet erscheinen ließen: Enzymspezifität, metabolische Stabilität und reversible Bindung an das Proteasom (Adams et al., 1998; Almond et al., 2002). Anhand der Peptid-Aldehyde und dem β -Lacton Lactacystin konnten dennoch viele Erkenntnisse über die Wirkungen von Proteasom-Inhibitoren in Zelllinien und Tumor-Xenografts gewonnen werden. So zeigte sich eine selektive Zytotoxizität für maligne transformierte im Vergleich zu normalen Zellen sowie eine Apoptoseinduktion von in Bcl-2 überexprimierenden Zellen (An et al., 1998), additive Wirkungen in Kombination mit konventionellen Zytostatika und eine niedrigere erforderliche Dosis in transformierten Zellen (Guzman et al., 2002) sowie eine Sensibilisierung von strahlenresistenten Zellen (Pajonk et al., 2000) oder chemoresistenten Zellen (Ogiso et al., 2000).

Es wurde vermutet, dass Peptid-Boronate das Proteasom durch Bindung an die Chymotrypsin-ähnliche Region des 20S CP inhibieren (Kettner et al., 1984; Adams et al., 1998). Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden verschiedenste Bipeptid-Boronate synthetisiert, die den Vorteil eines relativ geringen Molekulargewichts und einer einfachen Synthese aufweisen (Adams, 2003). 13 dieser Substanzen wurden

Einführung

einer genauen Wirksamkeitsprüfung in einem Panel von 60 Tumorzelllinien des *National Cancer Institute* (NCI) unterzogen (Adams et al., 1999). Die getesteten Substanzen zeigten hohe Wirksamkeit, eine selektive Hemmung des Proteasoms und eine reversible Aktivität. Ein Präparat, PS-341, später als Bortezomib (Abb. 5A) bezeichnet, zeichnete sich durch eine Hemmung des Proteasoms in niedrigem Bereich (K_i 0,6nM) und eine durchschnittliche Wachstumshemmung von 50% (GI_{50}) bereits in niedrigen Konzentrationen (7nM) aus. Es zeigte sich desweiteren eine enge Korrelation (Pearson Koeffizient, $r^2 = 0,92$) zwischen der intrinsischen Wirksamkeit der Substanz und seiner antiproliferativen Wirkung im Zellkulturassay. Die kompakte und wasserlösliche Substanz bindet an das Proteasom mit sehr hoher Affinität (Abb. 6) und dissoziiert nur langsam, somit liegt eine stabile, aber reversible Proteasomhemmung vor. Bortezomib zeigte in ersten präklinischen Untersuchungen hohe Wirksamkeit gegen Karzinomzelllinien verschiedenster Organe (Lunge, Kolon, Zentralem Nervensystem, Ovar, Nieren, Prostata, Mamma) und wies im Vergleich zu Daten von 60000 anderen Wirkstoffen ein einzigartiges Zytotoxizitätsprofil auf (Adams et al., 1999).

A



B

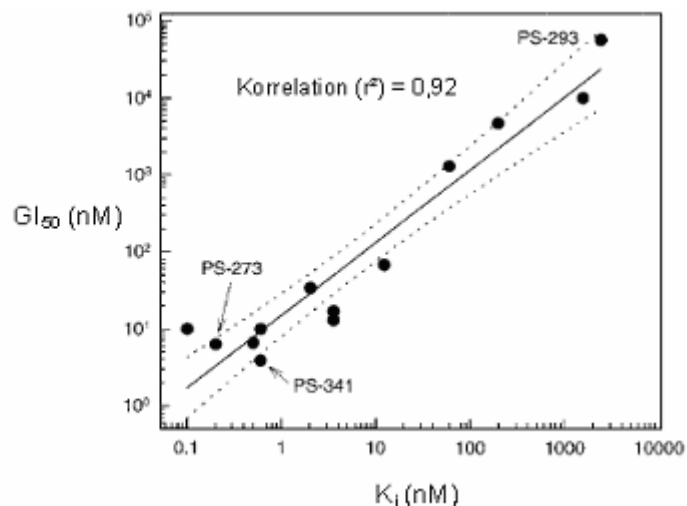


Abbildung 5: Bortezomib

(A) Strukturformel von Bortezomib (nach Adams, 2004)

(B) Korrelation (r^2) zwischen der inhibitorischen Potenz (K_i) des 20S Proteasoms 13 verschiedener Dipeptid-Boronat Inhibitoren und ihrer antiproliferativen Aktivität (GI_{50}) in 60 verschiedene Tumorzelllinien des *National Cancer Institute*. PS-273 zeigt eine geringe Spezifität für die Bindung an das Proteasom und PS-293 eine mangelnde Wirksamkeit (nach Adams et al., 1999)

Einführung

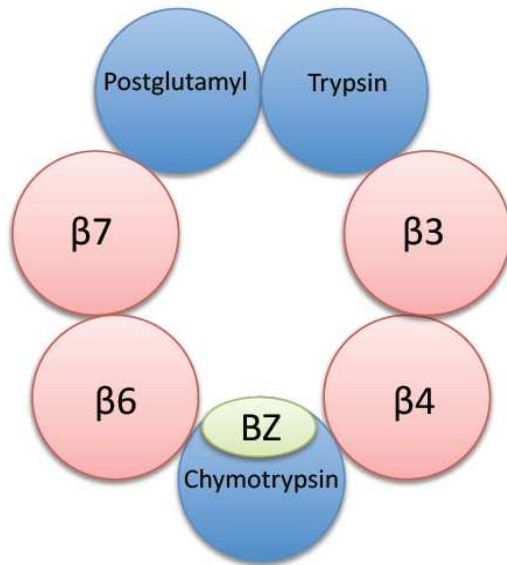


Abbildung 6: Bindungsstelle von Bortezomib im Proteasom

Schnittbild der Bortezomib (BZ)- Bindungsstelle im Proteasom. Bortezomib interagiert mit einem Threonin-Rest einer β -Untereinheit, die eine Chymotrypsin-ähnliche proteolytische Aktivität besitzt (modifiziert nach Adams, 2003).

1.3.2 Antineoplastische Wirksamkeit von Bortezomib *in vitro*

Nachdem Adams et al. 1999 erstmals die antineoplastische Wirksamkeit von Bortezomib in Karzinomzelllinien sowie in einem Xenograft-Modell zeigen konnten, und diese Beobachtungen wenig später *in vitro* und weiteren Xenograft-Modellen bestätigt werden konnten (Teicher et al., 1999; LeBlanc et al., 2002) wurde eine Vielzahl an präklinischen Studien durchgeführt, um die Wirksamkeit und den Wirkmechanismus von Bortezomib zu untersuchen. Präklinische Studien haben wiederholt eine selektive Sensitivität von maligne transformierten Zellen gegenüber Proteasom-Inhibition zeigen können (An et al., 1998; Orłowski et al., 1998; Masdehors et al., 1999; Soligo et al., 2001; Guzman et al., 2002). Dies lässt sich nur zum Teil auf die Beobachtung zurückführen, dass aktiv proliferierende Zellen empfindlicher gegenüber Proteasom-Inhibitor-vermittelter Apoptose sind als ruhende Zellen (Drexler 1997). So wurden Phäochromozytomzellen unabhängig von Proliferation nach Proteasom-Inhibition apoptotisch (Lopes et al., 1997) und chronisch lymphatische Leukämie (CLL) -Zellen, die sich vor allem in der G_0 -Phase des Zellzyklus befanden, empfindlich auf Proteasom-Inhibitor vermittelte Apoptose (Delic et al., 1998). Viele Anhaltspunkte sprechen für einen Zusammenhang zwischen der Hochregulation verschiedenster Funktionen des Ubiquitin-Proteasom Systems, die bedeutsam ist für maligne Transformation von Zellen sind und der erhöhten Empfindlichkeit von malignen Zellen für Proteasominhibition (Voorhees et al., 2006). So zeigen CLL Zellen eine 3-fach höhere Chymotrypsin-ähnliche Aktivität

Einführung

des Proteasoms als normale Lymphozyten (Masdehors et al., 2000). Ein niedriger Gehalt des CDK-Inhibitors p27^{KIP}, der beispielsweise auch in MCL-Zellen zu beobachten ist und mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist, wird als Folge einer erhöhten proteasomalen Degradation oder Hochregulation einer spezifischen Ubiquitin-Ligase angesehen (Chiarle et al., 2000; Bloom et al., 2003; Nalepa et al., 2003).

In zahlreichen *in vitro* Experimenten (Tab. 1) konnte Bortezomib bei unterschiedlichsten hämatologischen wie nicht-hämatologischen Zelllinien Apoptose induzieren. Hierbei zeigte sich, dass Bortezomib nicht nur eine potente Einzelsubstanz ist, sondern auch in verschiedensten Kombination mit anderen Substanzen additive oder synergistische Effekte zeigt. Vor allem eine chemosensibilisierende Wirkung, die zu einer höheren antiproliferativen Wirkung schon in niedrigeren Dosen konventioneller Zytostatika führt ist wiederholt bestätigt worden (Cusack et al., 2001; Tan et al., 2002; Fahy et al., 2003; Mitsiades et al., 2003; Yu et al., 2003; Adachi et al., 2004; Chauhan et al., 2004; Dai et al., 2004; Denlinger et al., 2004; Nawrocki et al., 2004; Bai et al., 2006; Catley et al., 2006; Cardoso et al., 2006; Nagy et al., 2006; Takigawa et al., 2006; Yanamandra et al., 2006).

Der Mechanismus, über den Bortezomib Apoptose induziert ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Die Stabilisierung von verschiedenen pro- und anti-apoptotischen Proteinen wie beispielsweise den CDK-Inhibitoren p21 oder p27^{KIP} und dem Tumorsupressor p53, sowie eine Verschiebung des Gleichgewichts hin zu pro-apoptotischen Proteinen könnte eine Ursache für durch Proteasom-Inhibitoren induzierte Apoptose sein (Adams, 2004). Ein Molekül mit einer zentralen Rolle in der Vermittlung von Wirkungen der Proteasominhibition ist NF-κB. Proteasom-Inhibitoren hemmen den Abbau von IκB. Dadurch verbleibt NF-κB im Cytoplasma und ist als Transkriptionsfaktor inaktiv. Diese Inaktivierung von NF-κB, die in zahlreichen Arbeiten bestätigt werden konnte, (Cusack et al., 2001; Hideshima et al., 2001, 2002; Sunwoo et al., 2001; Pham et al., 2003) liefert die Rationale für die Anwendung von Bortezomib in malignen Zellen, die NF-κB konstitutiv überexprimieren, sowie für Kombinationen mit konventionellen Chemotherapeutika oder Radiatio.

Einführung

Tabelle 1: Bortezomib in präklinischen Studien

Tumorart der Zelllinien	Referenzen
Chronisch myeloische Leukämie	Gatto et al., 2003; Yu et al., 2003; Dai et al., 2004
Mantelzelllymphom	Pham et al., 2003; Perez-Galan et al., 2006, 2007; Weigert et al., 2007
Multiples Myelom	Hideshima et al., 2001, 2003, 2004, 2005; LeBlanc et al., 2002; Ma et al., 2003; Mitsiades et al., 2003; Pei et al., 2003, 2004; Chauhan et al., 2004, 2004, 2004, 2005; David et al., 2005; Goel et al., 2005; Landowski et al., 2005; Yanamandra et al. 2006; Navas et al., 2006; Catley et al., 2006; Gomez-Bougie et al., 2007
T-Zell Leukämie	Tan et al., 2002; Satou et al., 2004; Nasr et al., 2005; Yu et al., 2006;
Kolorektales Karzinom	Cusack et al., 2001; Russo et al., 2001; Adachi et al., 2004; Minami et al., 2005; Zhu et al., 2005, 2005; Coquelle et al., 2006; Nagy et al., 2006;
Mammakarzinom	Teicher et al., 1999; Small et al., 2004; Cooper et al., 2004; Fahy et al., 2005; Lun et al., 2005; Nikrad et al., 2005; Cardoso et al., 2006; Codony-Servat et al., 2006; Fujita et al., 2006; Ishii et al., 2006; Marx et al., 2007; Xu et al., 2007
Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	Ling et al., 2002, 2003; Denlinger et al., 2004, 2004; Mortenson et al., 2004; Yang et al., 2004; Fahy et al., 2005; Takigawa et al., 2006; Jung et al., 2007; Liu et al., 2007; Neukirchen et al., 2007; Voortman et al., 2007;
Ovarialkarzinom	Frankel et al., 2000; Zhu et al., 2005; Bazzaro et al., 2006;
Pankreaskarzinom	Bold et al., 2001; Shah et al., 2001; Fahy et al., 2003, 2005; Nawrocki et al., 2004, 2005, 2005, 2006; Bai et al., 2005, 2006; Yeung et al., 2006;
Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals	Sunwoo et al., 2001; Fribley et al., 2004, Lun et al., 2005; Duan et al., 2007;
Prostatakarzinom	Adams et al., 1999; Frankel et al., 2000; An et al., 2003; Williams et al., 2003; Ikezoe et al., 2004; Fahy et al., 2005; Lashinger et al., 2005; Nikrad et al., 2005;

Allerdings kann die Inaktivierung von NF- κ B nicht allein die Wirkungen von Bortezomib erklären, da eine isolierte Blockade der NF- κ B Aktivierung eine geringere antiproliferativen Wirkung aufweist als eine Proteasomhemmung (Hideshima et al., 2002). Eine Reihe von Studien zeigt einen Zusammenhang zwischen der

Einführung

Akkumulation pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie und der Proteasom-Inhibitor induzierten Apoptose auf. So konnte ein ansteigender Spiegel der pro-apoptotischen Moleküle Bik oder Bim nach Bortezomib Gabe nachgewiesen werden, während Bak, Bax, Bcl-2 oder Bcl-x_L unbeeinflusst blieben (Nikrad et al., 2005; Zhu et al., 2005). Andere Arbeiten zeigten, dass Bortezomib im Zusammenhang mit einem G₂/M Arrest des Zellzyklus eine Phosphorylierung und Abbau von Bcl-2 induzieren kann (Ling et al., 2002), oder auch durch Aktivierung von Noxa Apoptose induziert (Perez-Galan et al., 2006).

Auch das endoplasmatische Retikulum (ER) kann Apoptose initiieren. Durch Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im ER kommt es zu ER-Stress, was bei Versagen von kompensatorischen Mechanismen zu Apoptose führt (Rutkowski et al., 2004). Da das Proteasom auch eine zentrale Rolle im Abbau von fehlgefalteten Proteinen spielt führt eine Hemmung des Proteasoms zu ER-Stress und konsekutiv zur Apoptose (Lee et al., 2003; Fribley et al., 2004; Nawrocki et al., 2005, 2005; Marx et al., 2007).

Zusammenfassend sind eine Vielzahl an Mechanismen beschrieben worden, die mit Proteasom-Inhibitor induzierter Apoptose assoziiert sind. Für den Wirkmechanismus von Bortezomib scheinen unterschiedliche Signalpfade eine Bedeutung zu haben, deren genaue Zusammenhänge jedoch weiterhin nicht abschließend geklärt sind.

1.3.3 Bortezomib in der Therapie bösartiger hämatologischer Erkrankungen

Bortezomib ist der erste Proteasom-Inhibitor, der von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) sowie von der Europäischen Arzneimittelbehörde EMA für die Therapie des multiplen Myeloms zugelassen wurde. In mehreren Studien wurde die Sicherheit und Wirksamkeit von Bortezomib belegt. Zwei Phase-I-Studien in soliden Tumoren und bösartigen hämatologischen Erkrankungen zeigten, dass Bortezomib mit akzeptabler Toxizität verabreicht werden kann (Aghajanian et al., 2002; Orlowski et al., 2002). Die ermutigenden Ergebnisse der präklinischen Untersuchungen und der Phase-I-Studien führten zu einer Phase-II-Studie (SUMMIT-Studie), in der 202 Patienten mit rezidivierendem oder therapieresistentem multiplem Myelom Bortezomib erhielten. Die Ansprechrate (OR) lag bei 27%, die mediane Zeit zur Progression (TTP) betrug 6,6 Monate und somit mehr als das doppelte

Einführung

vorangegangenen Therapien (Richardson et al., 2003). Die Wirksamkeit von Bortezomib im Vergleich zu Dexamethason bei refraktärem multiplen Myelom wurde in einer Phase-III-Studie untersucht. Die OR lag bei 38% bzw. 18%, das 1-Jahres Überleben bei 80% bzw. 66% und die mediane TTP bei 6,2 bzw. 3,5 Monaten für die beiden Therapieformen, und belegten statistisch signifikant die Überlegenheit von Bortezomib (Richardson et al., 2005). In nicht vorbehandelten Patienten mit multiplen Myelom zeigten sich unter Bortezomib Ansprechraten von 88% (CR und PR) (Jagannath et al., 2005). Auch die Kombination von Bortezomib mit anderen Substanzen wie Melphalan (Berenson et al., 2006), oder Melphalan plus Prednison (Mateos et al., 2006) wiesen beim multiplen Myelom hohe Ansprechraten auf.

Phase-II-Studien bei NHL belegten die hohe Wirksamkeit von Bortezomib insbesondere beim Mantelzelllymphom (Goy et al., 2005; O'Connor et al., 2005). In der Studie von Goy et al. zeigten zwölf von 29 MCL Patienten ein Ansprechen, davon sechs CRs. Diese Ergebnisse konnten auch in weiteren Studien beim MCL bestätigt werden. Belch et al. berichteten von einer Ansprechraten von 46,4%, die in vorbehandelten und nicht vorbehandelten Patienten vergleichbar war (46,7% und 46,2%). Bei Fisher et al. betrug die Ansprechraten 33% (8% CR) sowie die mediane TTP 6,2 Monate, die häufigsten beobachteten Arzneimittel-Nebenwirkungen werden in Tabelle 2 zusammengefasst. Im Rahmen einer Studie, auf deren Ergebnissen Bortezomib von der FDA für die Therapie von Patienten mit vorbehandeltem MCL zugelassen wurde zeigte sich eine OR von 31% und eine mediane Ansprechdauer von 9,3 Monaten (Kane et al., 2007). Die aktualisierten Daten der Phase-II PINNACLE-Studie bestätigen die klinische Wirksamkeit von Bortezomib mit einem medianen OS von 23,5 Monaten und einem medianen OS von 35,4 Monaten bei auf die Therapie ansprechenden Patienten (Goy et al., 2009). Dass Patienten von einer Bortezomib-Therapie trotz Resistenz gegenüber Chemotherapeutika profitieren können wird durch die Beobachtung gestützt, dass das PFS mit Bortezomib vergleichbar mit dem der vorhergehenden Therapie ist. Kreuzresistenzen mit konventionellen Substanzen sind daher nur in geringem Maße anzunehmen (O'Connor et al., 2009).

Einführung

Tabelle 2: Nebenwirkungen in $\geq 20\%$ aller Patienten (N=155), Inzidenz von Grad ≥ 3 Nebenwirkungen (gemäss NCI CTCAE version 3.0)
(modifiziert nach Fisher et al., 2006)

Ereignis	Insgesamt		Schwer (Grad ≥ 3)	
	N.	%	N.	%
Müdigkeit	95	61	19	12
Periphere Neuropathie	85	55	20	13
Obstipation	77	50	4	3
Diarrhoe	73	47	11	7
Übelkeit	68	44	4	3
Hautausschlag	43	28	4	3
Erbrechen	42	27	4	3
Anorexie	36	23	5	3
Benommenheit	36	23	5	3
Dyspnoe	35	23	7	5
Insomnie	33	21	1	<1
Thrombozytopenie	33	21	17	11
Muskuloskeletale Schmerzen	31	20	3	2
Ödeme untere Extremität	31	20	1	<1

2. Material und Methoden

2.1 Methoden der Zellkultur

2.1.1 Verwendete Zelllinien – Charakterisierung

Die in der Arbeit verwendeten Zelllinien sind die etablierten humanen MCL-Zelllinien Granta 519, HBL-2, JeKo-1, NCEB-1 und Rec-1 sowie als Kontrollzelllinien Jurkat (T-ALL) und Karpas 422 (diffus großzelliges Lymphom). Alle Zelllinien wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Deutschland bezogen. Eine Charakterisierung der einzelnen MCL Zelllinien ist in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Charakteristika der MCL Zelllinien
nach Drexler et al., 2002; Amin et al., 2003; DSMZ Homepage

Parameter	Granta 519	HBL-2	JeKo-1	NCEB-1	Rec-1
Alter	58	84	78	57	61
Geschlecht Patient	w	m	w	m	m
Entnahmeort	PB	LK	PB	PB	LK
Nachweis der t(11;14)(q13;q32)	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
Cyclin D1 Protein-Expression	Positiv		Positiv	Positiv	
p53 Protein-Expression	Positiv		Negativ		
TP53 Sequenz	Wildtyp	Mutiert	Wildtyp	Mutiert	Wildtyp
Retinoblastom-Protein	Positiv		Positiv	Deletiert	
Bcl-2 Protein-Expression	Positiv		Positiv		
Bax Protein-Expression	Positiv		Positiv		
Bcl-X _L Protein-Expression	Positiv		Positiv		
Mcl-1 Protein-Expression	Positiv		Positiv		

Abkürzungen: w, weiblich; m, männlich; LK, Lymphknoten; PB, Peripheres Blut

2.1.2 Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂- Gehalt und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Granta 519, JeKo-1, NCEB-1 und Rec-1 wurden in Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) in RPMI-1640 Medium kultiviert, das mit 20% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,4% Kanamycin versetzt wurde,

Material und Methoden

(HBL-2, Jurkat und Karpas 422 nur 10% FKS). Vor der ersten Verwendung wurde das FKS nach dem Auftauen bei 56°C im Wasserbad inaktiviert und in 50ml Röhrchen aliquotiert.

2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Zelllinien wurden nach dem Abzentrifugieren bei 1000rpm für 5 min. bei 4°C in 90% FKS und 10% vorgekühltem DMSO aufgenommen und sofort bei -80°C gelagert. Nach einigen Tagen wurden die tiefgefrorenen Zellen in flüssigem Stickstoff bei -180°C gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurde die Suspension schnell erwärmt, in 20 bis 25 ml Medium aufgenommen und sofort abzentrifugiert, um Reste des zytotoxischen DMSO zu entfernen. Um die Zellen in Kultur zu nehmen wurde der Überstand des Zentifugats verworfen und frisches Medium zugesetzt.

2.1.4 Bestimmung der Viabilität und Proliferation von Zellen mittels Trypanblau-Ausschluß-Test

Die Zelldichte viabler Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau zum Ausschluss toter Zellen bestimmt. Der Test basiert auf dem Prinzip, dass viable Zellen intakte Zellmembranen besitzen, die die Aufnahme von bestimmten Farbstoffen wie Trypanblau verhindern, während tote Zellen diese Fähigkeit verloren haben. 10µl Zellsuspension werden mit 10µl Trypanblau vermischt, auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und im Durchlichtmikroskop analysiert. Viable Zellen zeigen ein transparentes Zytoplasma, tote Zellen hingegen können durch ein blaues Zytoplasma identifiziert werden. Die Zelldichte wird durch die Anzahl der Zellen in vier Großquadraten bestimmt, wobei bei einer Mischung von Zellsuspension zu Trypanblau von 1:1 folgende Formel gilt:

$$(N_2) = (N_1/2) \times 10^4$$

Hierbei gibt (N_1) die Zellzahl in vier Großquadraten der Neubauer-Zählkammer an, (N_2) die Zellzahl pro ml Zellsuspension.

Material und Methoden

2.1.5 WST-1 Zell-Proliferationsassay

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität einer Zellpopulation wurde der so genannte WST-1 Assay verwendet, der auf der Metabolisierung des Tetrazoliums Salzes 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat zum ringoffenen Formazansalz (Abb. 7) und somit einem Farbumschlag beruht, der kolorimetrisch ausgewertet werden kann. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei, so dass die Reaktion spezifisch ist. Das Formazan kann nur von metabolisch aktiven Zellen gebildet werden, deren mitochondriale Dehydrogenasen das Tetrazoliums Salz zum Formazansalz umbauen. Eine zunehmende Anzahl vitaler Zellen resultiert in einem Anstieg der Gesamtaktivität mitochondrialer Enzyme und einer vermehrten Bildung des Tetrazoliums Salzes. Die dadurch stattfindende Änderung des Absorptionsmaximums lässt sich mit einem Spektrophotometer (ELISA-Reader) quantifizieren, allerdings findet die Formazan-Bildung auch im Rahmen des Massenwirkungsgesetzes statt, so auch nach Inhibitor-Behandlung eine geringe Restaktivität nachweisbar ist. Dieser methodische Fehler wird durch Normalisierung der erhaltenen Messwerte auf einen Leer-Wert beseitigt, der nur Medium und zugesetzte Reagenzien enthält. Der WST-1 Assay wurde mit Hilfe des Kits von Roche Diagnostics (Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden die Zellen auf die gewünschte Dichte ($1,0 \times 10^6$ /ml) eingestellt und in 96-Well-Platten mit flachem Boden ausgesät (100 μ l der eingestellten Zellsuspension). Jeder Wert wurde als Triplet angelegt und vermessen. Nach Inkubation über zwölf oder 24 Stunden wurden die Zellen mit 10 μ l WST-1 Reagenz versetzt und nach 4-stündiger Inkubation die optische Dichte (OD, $\text{Absorption}_{450\text{nm}} - \text{Absorption}_{690\text{nm}}$) am ELISA-Reader gemessen. Die Wellenlänge für die Messung der Absorption des Formazan-Produktes auf 450nm eingestellt, die Referenz-Wellenlänge betrug 690nm.

Material und Methoden

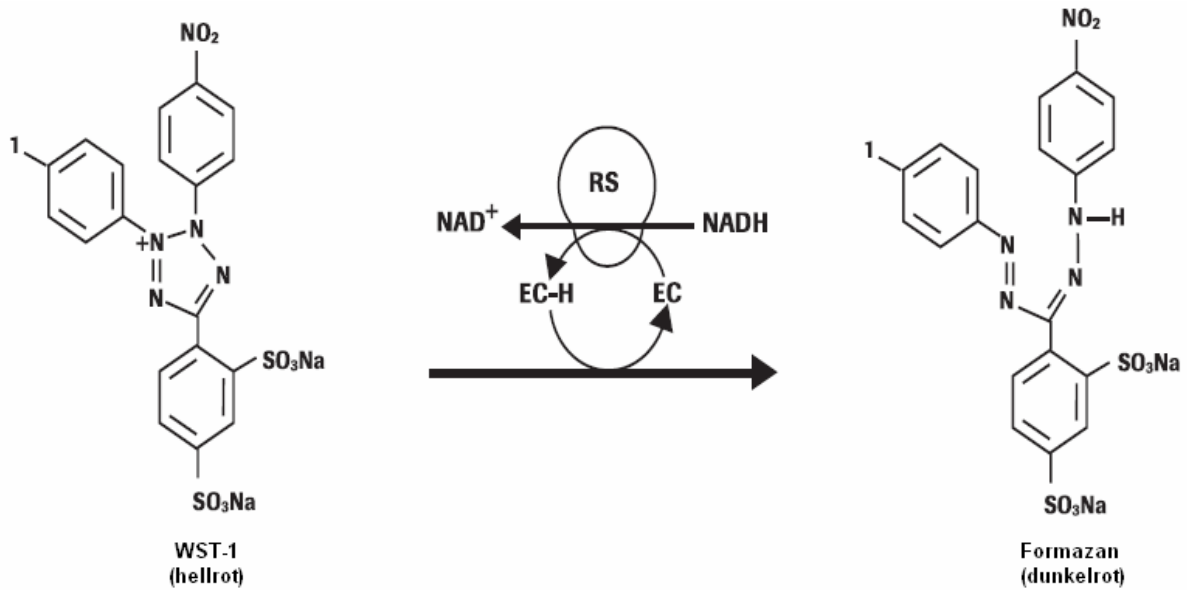


Abbildung 7: Spaltung des Tetrazoliumsalses WST-1

Das hellrote Tetrazoliumsals WST-1 wird durch das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase System (RS) zum dunkelroten Formazan gespalten. Der hierbei stattfindende Farbumschlag ist kolorimetrisch messbar und korreliert mit der Anzahl vitaler Zellen (Abbildung aus dem Manual des Herstellers Roche Diagnostics, Mannheim).

Aus drei erhaltenen Messwerten wurde der Mittelwert gebildet, der Mittelwert der Blank-Werte subtrahiert und die Differenz auf den Kontrollwert bezogen. Zur Quantifizierung der metabolischen Hemmung einer Substanz wurde der IC₅₀-Wert herangezogen, der die Konzentration eines Inhibitors angibt, bei dem die Aktivität der Zellen auf 50% des Betrags von unbehandelten Zellen gesenkt wird. Die Bestimmung der IC₅₀ erfolgte in drei unabhängigen Experimenten, Mittelwert und Standardabweichung der Einzelmessungen wurden angegeben.

2.1.6 Bestimmung von kombinatorischen Indizes nach Chou und Talalay

Zur Bewertung der Effekte zweier kombinierter Substanzen im Zellkulturmodell wurde die Methode nach Chou und Talalay herangezogen, die auf der Bestimmung der kombinatorischen Indizes Ci beruht (Chou et al., 1981, 1984). Dieser lässt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$C_i = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 + (D)_1(D)_2 / (D_x)_1(D_x)_2$$

Material und Methoden

Hierbei gibt $(D)_1$ und $(D)_2$ die Dosis der Inhibitoren 1 und 2 an, die in Kombination zu einem Effekt von x% führen, während $(D_x)_1$ und $(D_x)_2$ die jeweilige Dosis des Inhibitors nach Einzelgabe darstellen. Der Term der Gleichung $(D)_1(D)_2/(D_x)_1(D_x)_2$ geht nur für Inhibitoren in die Gleichung ein, deren jeweiliger Wirkmechanismus unabhängig ist. Ein nicht-unabhängiger Wirkmechanismus lässt sich aus dem parallelen Kurvenverlauf zweier Inhibitoren im Median-Effekt-Plot ersehen. Die oben genannte Gleichung besitzt unendlich viele Lösungen, die vom jeweiligen Wert x bestimmt werden, also in welchem Dosisbereich der Inhibitoren C_i errechnet wird. In der Literatur wird häufig ein C_i für die IC_{50} , IC_{75} und IC_{90} angegeben. Um diese C_i -Werte zu berechnen, müssen allerdings (D) und (D_x) genau bestimmt werden. Für die Berechnung des C_i bei IC_{50} ergibt sich dann folgende Gleichung:

$$C_i (IC_{50}) = (D50)_{1+2}/(D50)_1 + (D50)_{1+2}/(D50)_2$$

Hierbei gibt $(D50)_1$ und $(D50)_2$ die IC_{50} -Werte für die Einzelsubstanzen an, $(D50)_{1+2}$ den IC_{50} Wert bei Kombination der beiden Substanzen. Die C_i -Werte wurden mit Hilfe der CalcuSyn Software berechnet. Ein rein additiver Effekt zweier Substanzen liegt bei einem C_i von $1 \pm 0,3$ vor, ein synergistischer Effekt bei $C_i < 0,7$ und ein antagonistischer Effekt bei $C_i > 1,3$.

2.1.7 Apoptose Detektion mit Annexin V-PE und 7-AAD-Färbung

Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen in einer Kultur wurde das „Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I“ von BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Der Test beruht auf einer Doppelfärbung von apoptotischen beziehungsweise toten Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V und dem rötlichen 7-AAD. Eines der ersten Anzeichen für das Einsetzen von Apoptose in Zellen ist der Verlust der Membran-Asymmetrie der Zellen, es kommt zur Exposition des Membranphospholipids Phosphatidylserin (PS) auf der äußeren Plasmamembran. Dieser Prozess tritt neben dem Verlust des Membranpotentials und der verstärkten Produktion von Superoxid-Anion-Radikalen vor der nukleärer Apoptose mit Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung auf (Casted et al., 1996). Mittels Annexin V, einem Ca^{2+} -

Material und Methoden

abhängigem, Phospholipid-bindendem Protein mit hoher Affinität für PS können Zellen bereits in einem frühen Stadium der Apoptose identifiziert werden. Annexin V wird an Fluorochrome wie Phycoerythrin (PE) gekoppelt, wodurch es als sensitive Sonde für die durchflusszytometrische Analyse apoptotischer Zellen besonders geeignet ist. Die Anfärbbarkeit von Zellen mit Annexin V-PE geht dem Verlust der Membranintegrität voraus, der die späten Stadien des programmierten Zelltods charakterisiert. Daher wird die Färbung mit Annexin V-PE typischerweise mit einem so genannten Vitalfarbstoff wie 7-Aminoactinomycin (7-AAD) kombiniert. 7-AAD kann zwischen Cytosin und Guanin interkalieren und nur in Zellen mit nicht mehr intakter Membranintegrität eindringen. Mittels Doppelfärbung kann zwischen intakten Zellen (Annexin V-PE negativ, 7-AAD negativ), frühapoptotischen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD negativ) und spätapoptotischen Zellen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD positiv) unterschieden werden. Vollkommen nekrotische Zellen (Annexin V-PE negativ, 7-AAD positiv) gingen nicht in die Auswertung ein. Für jede Analyse wurden die korrekten Einstellungen des Durchflusszytometers anhand von ungefärbten bzw. einfachgefärbten Zellen ermittelt. Annexin V-PE wurde in Fluoreszenzkanal FL-2 und 7-AAD in Fluoreszenzkanal FL-3 detektiert. Die Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe des Analyseprogramms WinMDI[®]. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen wurde mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$[1 - (A_{I,b}/A_{I,u})] \times 100\%$$

Hierbei steht $A_{I,b}$ für den Anteil vitaler behandelter Zellen, $A_{I,u}$ für den Anteil vitaler unbehandelter Zellen. Einen repräsentativen Densityplot zeigt Abbildung 8.

Material und Methoden

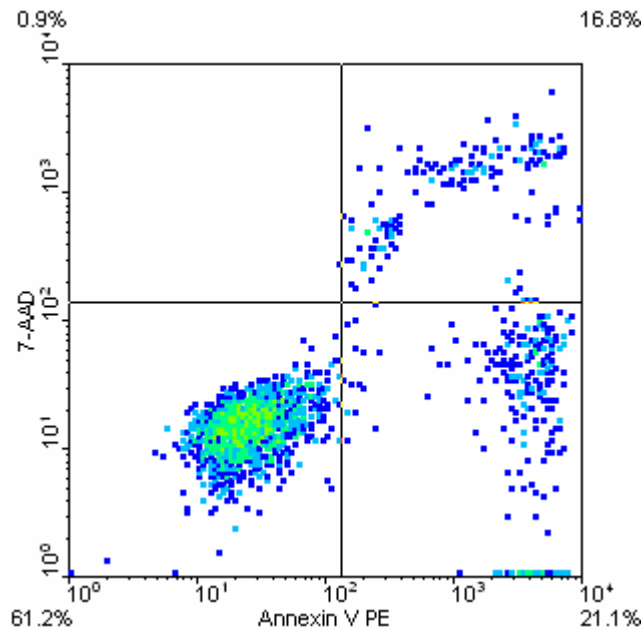


Abbildung 8: Apoptosedetektion mit Annexin V-PE und 7-AAD

Im unteren linken Quadranten befinden sich intakte Zellen (Annexin V-PE negativ, 7-AAD negativ, hier 61,2%), im unteren rechten Quadranten frühapoptotische Zellen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD negativ, hier 21,1%) und im oberen rechten Quadranten spätapoptotische Zellen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD positiv, hier 16,8%).

2.1.8 Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid Färbung

Zur Durchführung von Zellzyklusanalysen wurden die Zellen gezählt und auf 200 000 pro FACS-Röhrchen eingestellt. Anschließend wurden die Ansätze einmal mit kaltem PBS gewaschen, auf Eis mit 200 µl Lysis-Puffer für die PI-Färbung versetzt und 5 min. unter Lichtausschluss lysiert. Sofort nach der Lyse wurden die Zellen im Durchflußzytometer analysiert. Es wurden mindestens 10 000 Zellen gemessen und die Ergebnisse mit Hilfe von ModFit LT™ ausgewertet. In der Histogramm-Darstellung wurde auf der X-Achse die Fluoreszenz-Intensität und auf der Y-Achse die Anzahl der detektierten Ergebnisse linear aufgetragen. Der erste Peak repräsentiert Zellen in der G₀/G₁-Phase und der zweite Peak, der etwa die doppelte Intensität des ersten Peaks aufweist Zellen der G₂/M-Phase (s. Abb. 15). Der Bereich zwischen den Peaks stellt die Zellen in der S-Phase dar. Apoptotische Zellen, die DNA-Fragmentationen aufweisen und im Sub-G₁-Bereich lagen, wurden bei der Auswertung der Zellzyklusverteilung nicht berücksichtigt.

Material und Methoden

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien wie Lösungsmittel und sonstige Reagenzien wurden von Merck KG (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.2.2 Lösungen und Puffer

Zellkulturmedien (RPMI 1640 mit L-Glutamin) FKS und DPBS wurden bei PAN-Biotech GmbH (Aidenbach) bezogen.

Selbst hergestellte Lösung:

Lysis-Puffer für PI Färbung	Natriumcitrat	100mg
	Triton X-100	100µl
	Propidiumiodid	2mg
	Aqua purificata	ad 100ml
	pH 8.0 mit HCl	

2.2.3 Verwendete Inhibitoren und Zytostatika

Bortezomib	Stock à 100 nM in Aqua pur.	Millenium (Cambridge, MA, USA)
Cytarabin	Stock à 50 mg/ml in PBS	Cell pharm GmbH (Hannover)
Fludarabin	Stock à 25 mg/ml in PBS	Medac GmbH (Wedel)
Gemcitabin	Stock à 40 mg/ml in PBS	Eli Lilly (Wien, Österreich)
Mitoxantron	Stock à 2 mg/ml in PBS	Hexal AG (Holzkirchen)

Material und Methoden

2.2.4 Verwendete Softwareprogramme

CalcuSyn 2.0	Biosoft (Cambridge, UK)
Cellquest	Bekton Dickenson (Mountain View, CA, USA)
EndNote 9	Thompson ISI Researchsoft (Carlsbad, CA, USA)
ModFit LT	Verity Software House (Topsham, ME, USA)
MS-Office 2002	Microsoft (Redmond, WA, USA)
SigmaPlot 2000	SPSS Incorporated (Chicago, IL, USA)
SoftMax Pro	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)
WinMDI 2.8	Joseph Trotter

2.2.5 Verwendete Geräte

Durchflußzytometer: BD FACS Calibur	BD Biosciences (Palo Alto, CA, USA)
ELISA-Reader: Optimax pro	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)

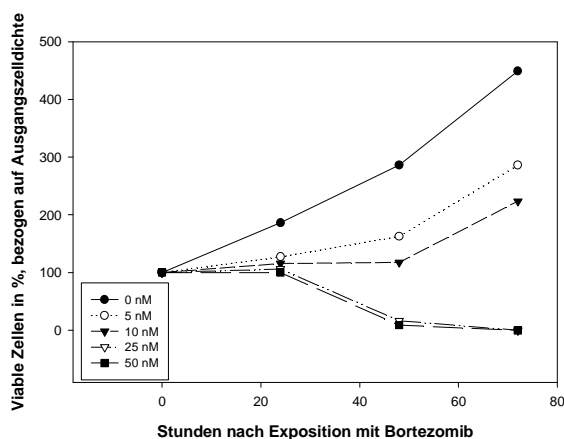
3. Ergebnisse

3.1 Proliferationshemmung durch Bortezomib

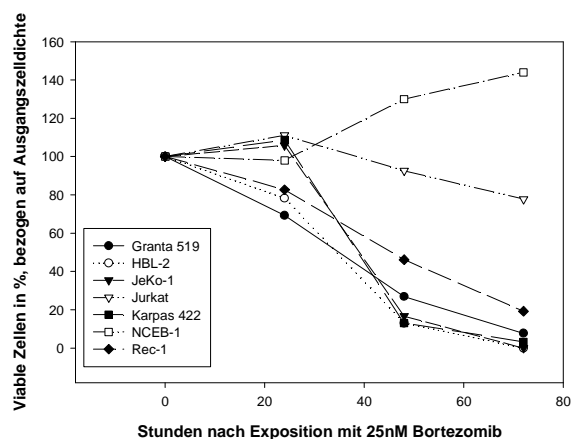
3.1.1 Bortezomib führt bei 72-Stunden Langzeitexposition zu einer dosis- und zeitabhängigen Proliferationshemmung in Zelllinien

Zunächst wurde in einem initialen Experiment die antiproliferative Wirkung von Bortezomib auf MCL-Zelllinien (Granta 519, HBL-2, JeKo-1, NCEB-1, Rec-1) und Kontrollzelllinien (Jurkat, Karpas 422) in 72-stündiger Exposition untersucht. Hierzu wurden die Zellen bei einer Ausgangszellichte von $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ ausgesät und über 72 Stunden mit verschiedenen Dosen von Bortezomib (0, 5, 10, 25 und 50 nM) inkubiert. Es zeigte sich eine dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung in allen Zelllinien, wobei die Empfindlichkeit auf den Proteasom-Inhibitor innerhalb der MCL-Zelllinien stark variierte (Abb. 9). Während beispielsweise bei JeKo-1 als empfindlichster Zelllinie nach 48-stündiger Exposition mit 25nM Bortezomib nur noch 16,7% im Vergleich zu nicht behandelten Zellen vital sind, zeigt sich bei NCEB-1 nach gleicher Exposition eine zunehmende Zelldichte, die bei 130% der unbehandelten Zellen liegt. Beim Vergleich von MCL- zu Kontrollzelllinien lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der Empfindlichkeit auf Bortezomib feststellen, die antiproliferative Wirkung ist in Karpas 422 allerdings größer als in Jurkat. Da sich bei einer mittleren Dosis von 25 nM, die auch klinisch erreicht wird, in allen Zelllinien eine antiproliferative Wirkung von Bortezomib zeigt, wurde diese Dosis festgelegt, um die Effekte des Inhibitors auf Apoptose und Zellzyklus eingehender zu untersuchen.

A



B



Ergebnisse

Abbildung 9: Proliferationshemmung durch Bortezomib

Mantelzelllymphom- und Kontrollzelllinien wurden mit einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ /ml ausgesät und über 72 Stunden mit Bortezomib kultiviert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen gezählt und die Viabilität mittels Trypanblau-Ausschluß-Test bestimmt. (A) gibt die proliferationshemmende Wirkung von Bortezomib in der Zelllinie JeKo-1 an. (B) zeigt die deutlichen Unterschiede in der Empfindlichkeit auf Bortezomib.

Da die einzelnen Zelllinien unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten, verdeutlicht durch unterschiedliche Zellverdopplungszeiten aufweisen und in obiger Darstellung die Werte nach Exposition mit dem Inhibitor auf den Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 bezogen werden, ist der direkte Vergleich zwischen den Zelllinien in dieser Form nur eingeschränkt möglich. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden daher die Zellzahlen bei Exposition mit 25 nM auf den jeweiligen Wert unbehandelten Zellen bei 24, 48 und 72 Stunden bezogen und so die Vergleichbarkeit vereinfacht (Tab. 4b, Abb. 10).

Tabelle 4a: Zellzahlen nach Bortezomib Exposition

in %, bezogen auf den Ausgangswert bei 0 h

Zelllinie	Konzentration Bortezomib	0 h	24h	48h	72h
Granta 519	0 nM	100	146,15	200	273,08
	25 nM	100	69,23	26,92	7,69
HBL-2	0 nM	100	186,96	269,57	347,83
	25 nM	100	78,26	13,04	0
JeKo-1	0 nM	100	186,27	286,27	449,02
	25 nM	100	105,88	16,67	0
Jurkat	0 nM	100	146,29	216,67	294,44
	25 nM	100	111,11	92,59	77,78
Karpas 422	0 nM	100	226,09	302,17	391,30
	25 nM	100	108,70	13,04	3,26
NCEB-1	0 nM	100	126,00	184,00	192,00
	25 nM	100	98,00	130,00	144,00
Rec-1	0 nM	100	149,04	167,31	298,08
	25 nM	100	82,69	46,15	19,23

Ergebnisse

Tabelle 4b: Zellzahlen nach Bortezomib Exposition
in %, bezogen auf den jeweilige unbehandelte Zellzahl

Zelllinie	Konzentration Bortezomib	0 h	24h	48h	72h
Granta 519	0 nM	100	146,15	200	273,08
	25 nM	100	47,37	13,46	2,82
HBL-2	0 nM	100	186,96	269,57	347,83
	25 nM	100	41,86	4,84	0
JeKo-1	0 nM	100	186,27	286,27	449,02
	25 nM	100	56,84	5,82	0
Jurkat	0 nM	100	146,29	216,67	294,44
	25 nM	100	75,95	42,74	26,42
Karpas 422	0 nM	100	226,09	302,17	391,30
	25 nM	100	48,08	4,32	0,83
NCEB-1	0 nM	100	126,00	184,00	192,00
	25 nM	100	77,78	70,65	75
Rec-1	0 nM	100	149,04	167,31	298,08
	25 nM	100	55,48	27,58	6,45

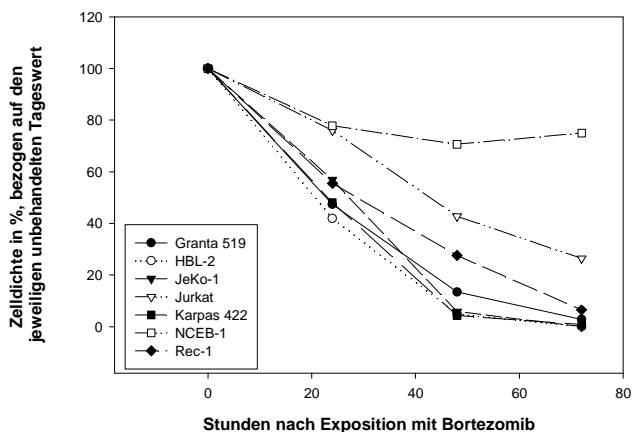


Abbildung 10: Vergleich der Wachstumskurven bei 25nM

Bei dieser Darstellung wurde die Zelldichte nach 24, 48 und 72 Stunden der mit 25nM behandelten Zellen auf den jeweiligen Wert der unbehandelten Zelllinie bezogen.

Auch bei obiger Darstellung zeigt sich, dass NCEB-1 und Jurkat am unempfindlichsten auf Bortezomib Exposition sind (75% und 26,42% lebende Zellen nach 72 Stunden), während alle anderen Zelllinien eine ähnliche höhere Empfindlichkeit auf den Proteasom-Inhibitor zeigen (zwischen 0% und 6,45% viable Zellen)

Ergebnisse

3.1.2 Die IC₅₀-Werte nach 24-Stunden Exposition mit Bortezomib unterscheiden sich deutlich innerhalb der Mantelzelllymphom- und Kontrollzelllinien

Um die antiproliferative Wirkung von Bortezomib auf Zelllinien genauer beurteilen und vergleichen zu können wurde der WST-1 Assay herangezogen. Hierzu wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^6 /ml ausgesät, mit einer Konzentration zwischen 0 und 100 nM Bortezomib über 24 Stunden inkubiert und anschließend ihre metabolische Aktivität mittels des kolorimetrischen WST-1 Assays analysiert. Zum Vergleich der antiproliferativen Wirkung des Inhibitors wurde der IC₅₀-Wert herangezogen, der die Konzentration angibt, bei dem die Proliferation der behandelten Zellen auf die Hälfte des Betrags der unbehandelten Zellen abgesunken ist. Wie bereits in den 72-stündigen Wachstumskurven zeigten die Zelllinien deutliche Unterschiede in der Empfindlichkeit auf den Inhibitor. Den höchsten IC₅₀-Wert wies NCEB-1 mit $44,5 \pm 9,1$ nM auf, gefolgt von Rec-1 ($28,2 \pm 0,4$ nM), Granta 519 ($25,2 \pm 4,2$ nM), Jurkat ($24,4 \pm 0,3$ nM), HBL-2 ($22,4 \pm 2,6$ nM), Karpas 422 ($20,3 \pm 2,2$ nM) und JeKo-1 ($14,8 \pm 1,3$ nM). Somit bestätigten sich die Ergebnisse der Zellzahlmessung im WST-1 Assay, wo sich NCEB-1 deutlich unempfindlicher mit einem IC₅₀-Wert, der das 1,6 bis 3-fache der anderen Zelllinien beträgt zeigt. Interessanterweise sind die Unterschiede in der Empfindlichkeit auf den Proteasom-Inhibitor innerhalb der MCL-Zelllinien deutlich stärker ausgeprägt als zwischen MCL- und Kontrollzelllinien. So beträgt der IC₅₀-Wert für NCEB-1 das 3-fache des Werts von JeKo-1. Im Gegensatz dazu sind die IC₅₀-Werte der Kontrollzelllinien, die den Entitäten T-ALL und diffus großzelliges Lymphom zuzurechnen mit 25 ± 5 nM vergleichbar. Am empfindlichsten auf Bortezomib Treatment ist, wie auch bei den 72-Stunden Wachstumskurven die Zelllinie JeKo-1 mit einem IC₅₀-Wert von $14,8$ nM ($\pm 1,3$). Dieser Wert liegt deutlich unter den 25 nM, die *in vivo* bei einer Administration von $1,5$ mg/m² erreicht werden, und der für die Analyse von Apoptose und Zellzyklus verwendet wurde. Somit lassen sich aus den Ergebnissen des WST-1 Assay drei verschiedene Gruppen an Zelllinien identifizieren: Zum einen die weitgehend refraktäre Zelllinie NCEB-1, desweiteren Zelllinien intermediärer Empfindlichkeit, deren IC₅₀-Werte um 25 ± 5 nM betragen (Granta 519, HBL-2, Rec-1 Jurkat, Karpas 422) sowie die Zelllinie JeKo-1, die deutlich empfindlicher auf Bortezomib Exposition ist.

Ergebnisse

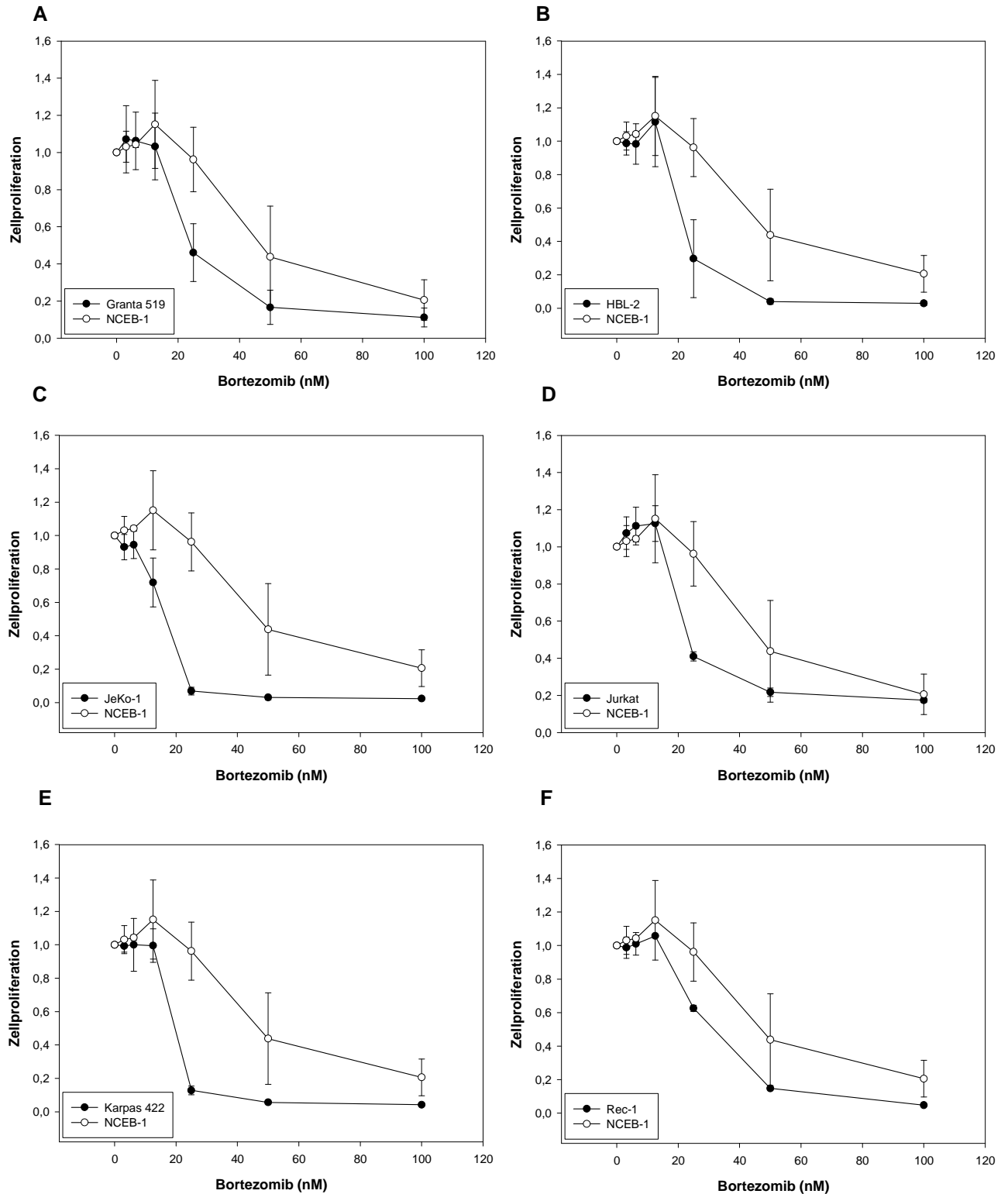


Abbildung 11: Metabolischer Effekt von Bortezomib

Mantelzelllymphom- und Kontrollzelllinien wurden über 24h mit steigenden Dosen Bortezomib kultiviert und anschließend mittels WST-1 Assay analysiert. Die Kurvenverläufe von (A) Granta 519, (B) HBL-2, (C) JeKo-1, (D) Jurkat, (E) Karpas 422 und (E) Rec-1 werden jeweils im Vergleich zur am wenigsten empfindlichen Zelllinie NCEB-1 gezeigt. Die Abbildungen zeigen jeweils Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten

Ergebnisse

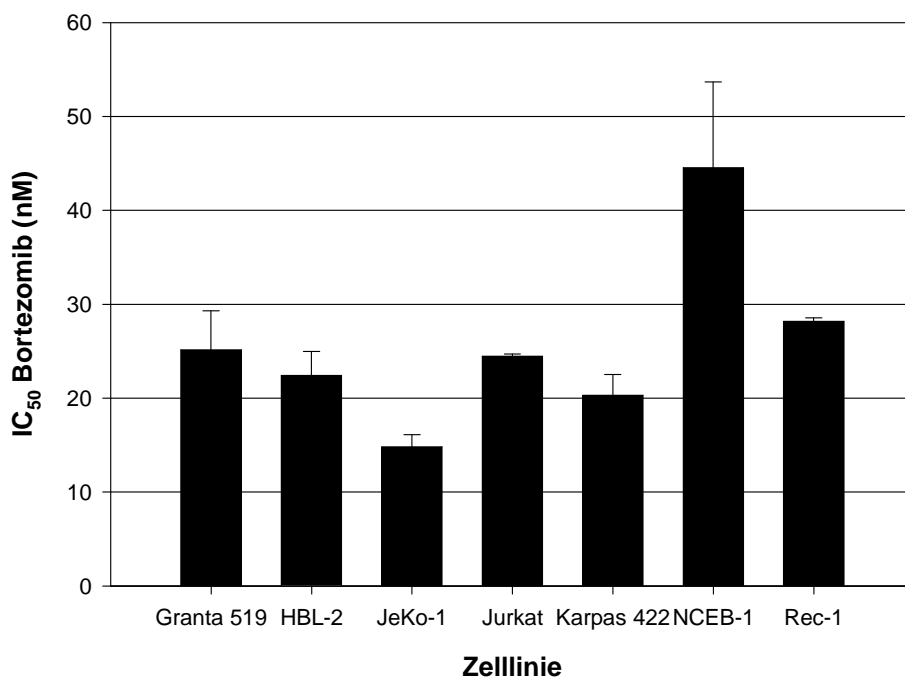


Abbildung 12: IC₅₀-Werte für Bortezomib

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 0 bis 100 nM Bortezomib inkubiert und mittels WST-1 Assay die IC₅₀-Werte bestimmt. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

3.2 Induktion von Apoptose durch Bortezomib

3.2.1 Bortezomib induziert im 24-Stunden Versuch Apoptose in Mantelzelllymphom Zelllinien

Bortezomib kann in einer Vielzahl von Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten Apoptose induzieren. Die nach den initialen 72-Stunden Wachstumskurven und der IC₅₀-Bestimmung festgelegte Konzentration von 25 nM Bortezomib wurde herangezogen, um das Ausmaß der induzierten Apoptose nach Bortezomib Behandlung in MCL-Zelllinien zu bestimmen. Zellen wurden mit einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ /ml ausgesät und der Anteil der apoptotischen Zellen initial, d.h. vor Behandlung sowie 12 und 24 Stunden nach Bortezomib-Exposition durchflußzytometrisch analysiert. Anhand der Doppelfärbung mit Annexin V-PE und 7-AAD konnte in den Versuchen zwischen den Populationen von früh- und spätapoptischen Zellen unterschieden werden und durch die Analyse zu

Ergebnisse

verschiedenen Zeitpunkten auch deren zeitlicher Verlauf bestimmt werden. In die Auswertung miteinbezogen wurde der Gesamtprozentsatz an apoptotischen Zellen. Bezogen auf die initiale Gesamtzahl viabler Zellen wiesen die MCL-Zelllinien nach Behandlung mit Bortezomib über 12 bzw. 24 Stunden einen Anteil an apoptotischen Zellen zwischen 17,6% und 50,0% bzw. 24,7% und 77,9% auf. In der Analyse der Apoptoseinduktion bestätigten sich die auf den IC_{50} -Werten basierende Einteilung der Zellen mit unterschiedlicher Empfindlichkeit auf den Proteasom-Inhibitor. NCEB-1 war auch bezüglich der Apoptoseinduktion nach 24 Stunden die resistenste Zelllinie, mit einem Anteil an apoptotischen Zellen von 24,7% ($\pm 0,4$), gefolgt von Rec-1 mit 61,2% ($\pm 4,9$), HBL-2 mit 68,4% ($\pm 4,9$), Granta 519 mit 69,2% ($\pm 1,7$) und JeKo-1 mit 77,9% ($\pm 0,9$). Somit ist sowohl bei der Proliferationsinhibition als auch bezüglich der Apoptoseinduktion NCEB-1 als die Zelllinie identifiziert, die am geringsten auf Bortezomib Behandlung anspricht, während JeKo-1 in beiden Methoden die empfindlichste Zelllinie war. Auch die quantitative Apoptoseinduktion der anderen MCL-Zelllinien auf entspricht den Ergebnissen des WST-1 Assay. Bei einer Dosis von 25nM führt Bortezomib in allen MCL-Zelllinien nach 24 Stunden zu einer Induktion von Apoptose, die abgesehen von NCEB-1 50% oder mehr beträgt. Interessanterweise nimmt die Apoptoseinduktion über 24 Stunden in unterschiedlichen Zelllinien deutlich zu. Am auffälligsten zeigt sich dies in JeKo-1 Zellen, die 12 Stunden nach Behandlung nur 17,6% ($\pm 3,9$) apoptotische Zellen aufweisen und somit weniger als die unempfindliche Zelllinie NCEB-1 (18,2 \pm 2,4%), während nach 24 Stunden 77,9% ($\pm 0,9$) apoptotische Zellen nachzuweisen sind. (siehe auch Abb. 13 und 14).

Ergebnisse

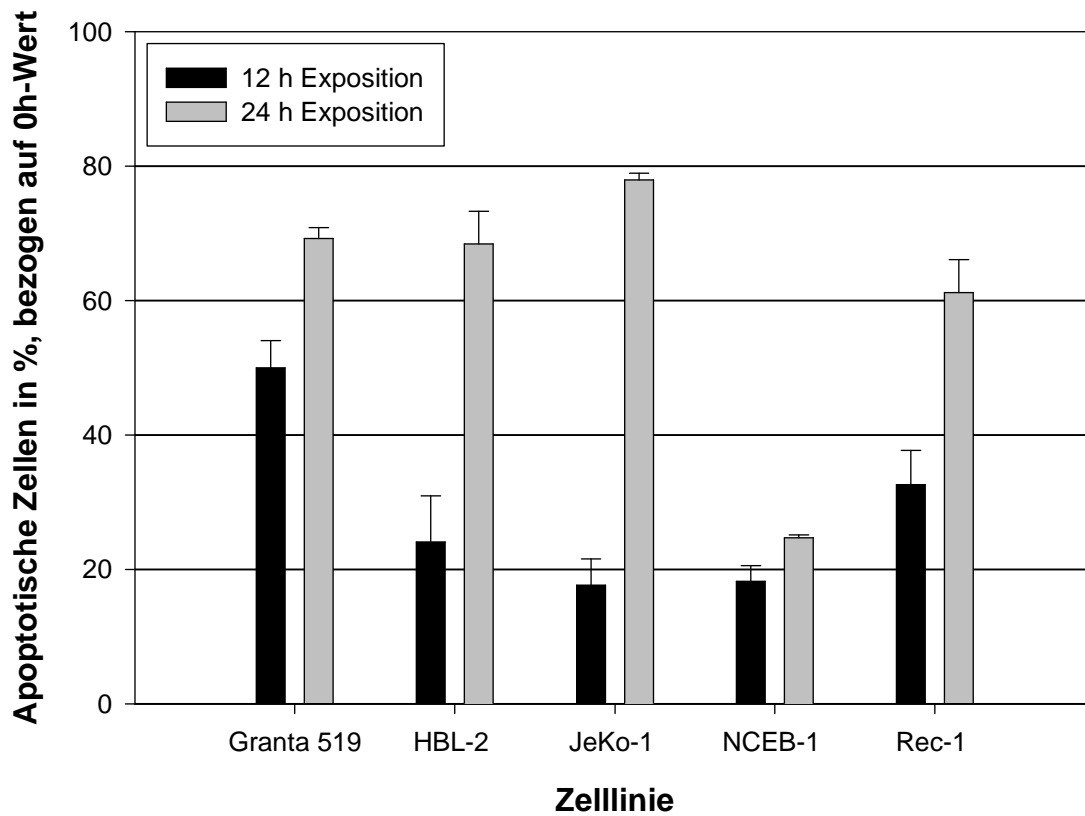


Abbildung 13: Apoptoseinduktion in Mantelzelllymphom Zelllinien

Zellen wurden über 24 Stunden mit 25 nM Bortezomib inkubiert, Apoptose wurde zum Zeitpunkt 0, 12 und 24 Stunden durchflußzytometrisch bestimmt. Gezeigt werden jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

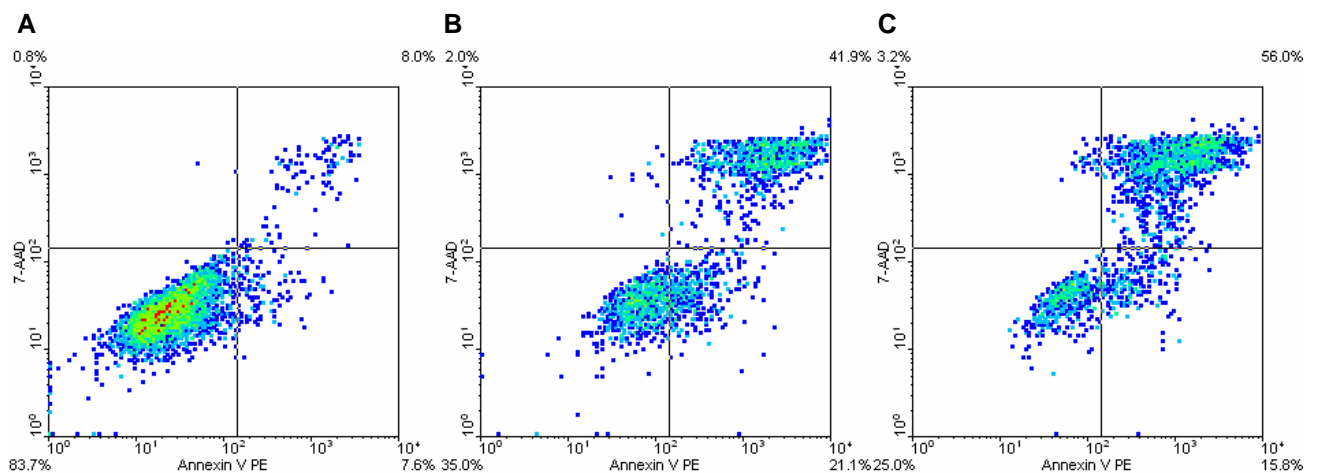


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Apoptoseinduktion nach Bortezomib-Exposition

Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Densityplot der Zelllinie Granta 519 unmittelbar vor Exposition (A) sowie 12 Stunden (B) bzw. 24 Stunden (C) nach Behandlung mit 25 nM Bortezomib.

Ergebnisse

3.2.2 Die Empfindlichkeit auf Bortezomib ist nicht Mantelzelllymphom-spezifisch

Um zu verifizieren, ob die Apoptoseinduktion durch Bortezomib in einer Konzentration von 25 nM MCL-spezifisch ist, wurden auch die Kontrollzelllinien Jurkat und Karpas 422 in identischer Weise mit dem Proteasom-Inhibitor behandelt und anschließend durchflußzytometrisch analysiert. In Jurkat- als auch in Karpas 422-Zellen induziert Bortezomib Apoptose, allerdings sind sowohl zwischen den Zelllinien, als auch im Vergleich zu den Ergebnissen des WST-1 Assay deutliche Unterschiede festzustellen. Während der Anteil der apoptotischen Zellen nach 24 Stunden in Jurkat bei 19,3% ($\pm 2,9$) liegt, und somit noch über dem Wert von NCEB-1, waren bei Karpas 422 nach 24-stündiger Inkubation mit 25 nM Bortezomib 92,9% ($\pm 2,6$) der Zellen apoptotisch. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Apoptoseinduktion nach Bortezomib nicht MCL-spezifisch ist, sondern in der gewählten Dosis auch in Zelllinien anderer Lymphomentitäten Zelltod induzieren kann.

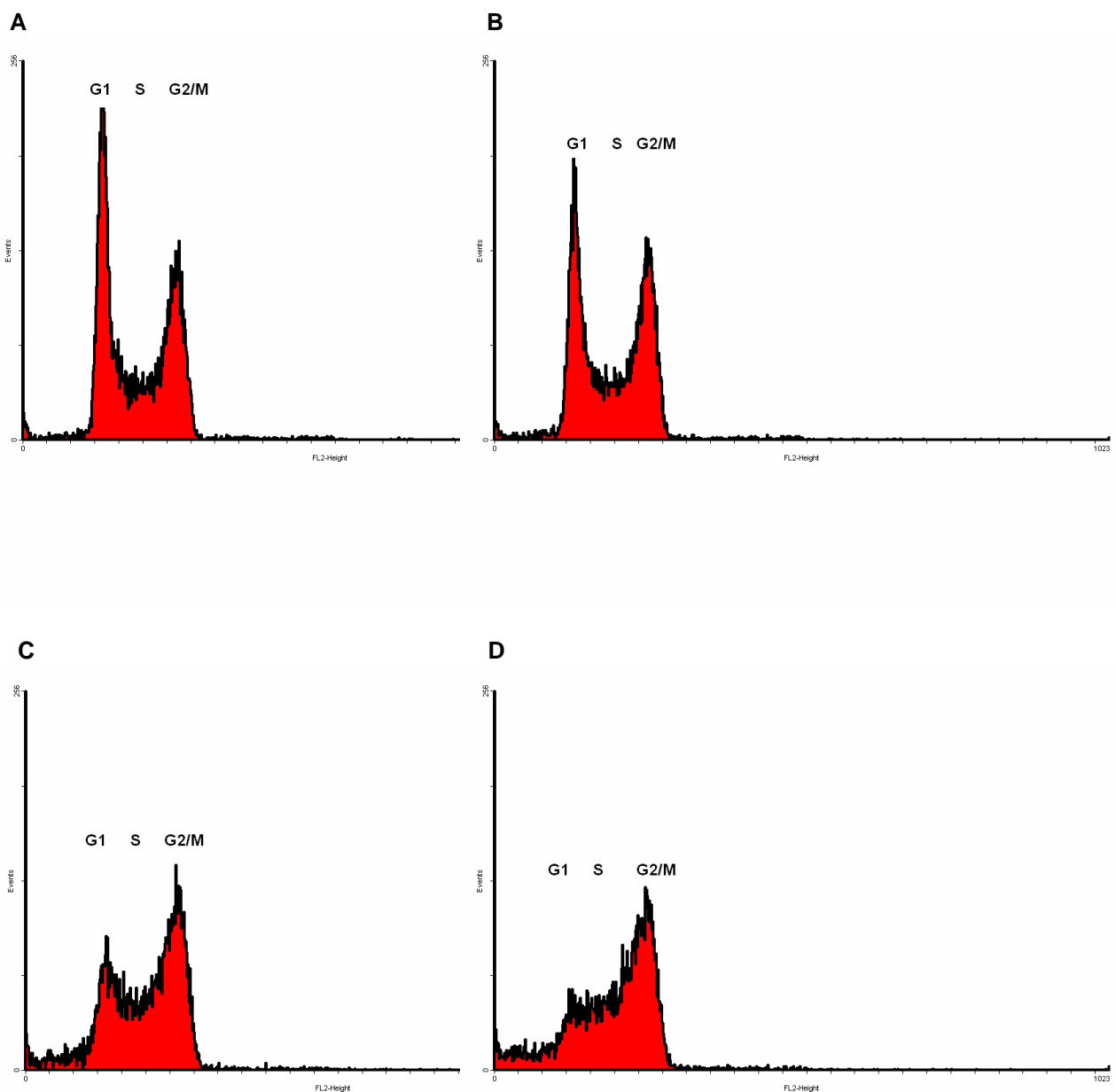
3.3 Auswirkungen von Bortezomib auf den Zellzyklus

3.3.1 Veränderungen im Zellzyklusprofil sind ein frühes Ereignis nach Exposition mit Bortezomib

Um den Mechanismus der antiproliferativen Wirkung von Bortezomib auf MCL-Zelllinien weiter zu untersuchen wurden Zellzyklus-Analysen mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt. Hintergrund dieses Versuchs war vor allem die Frage, ob die Proliferationshemmung primär über eine Apoptoseinduktion oder durch eine Zellzyklus-dysregulation vermittelt wird. Um auch den zeitlichen Verlauf nach Inhibitorgabe verfolgen zu können, wurden die Analyse vor Administration der Substanz sowie 4, 8 und 12 Stunden nach Bortezomib-Behandlung durchgeführt. Diese frühen Zeitpunkte wurden gewählt, da schon nach 12 Stunden in den meisten Zelllinien eine hohe Zellzahl apoptotisch waren. Da die Apoptose die Endstrecke unterschiedlichster zytotoxischer Mechanismen darstellt und mit einer Vielzahl an intrazellulären Vorgängen assoziiert ist, wurden Veränderungen der Zellzyklusregulation zeitlich vor der Apoptoseinduktion vermutet. Nach Bortezomib-

Ergebnisse

Behandlung wurde in allen Zelllinien ein Anstieg im Sub-G₁-Bereich beobachtet, der mit längerer Expositionsdauer zunahm und einen Marker für apoptotische Nuclei darstellt. Diese Zellen sind allerdings nicht dem eigentlichen Zellzyklus zuzuordnen und gehen daher nicht in die Berechnung der Zellzyklusphasen ein. In allen MCL-Zelllinien veränderte sich nach Gabe von 25 nM Bortezomib das Zellzyklusprofil. Die Veränderungen traten innerhalb der ersten zwölf Stunden nach Inhibitorgabe auf und zeigten bei sequenzieller Analyse einen kontinuierlichen Anstieg an Zellen in der G₂/M-Phase, während für die G₀/G₁-Phase ein fortlaufender Abfall beobachtet wurde (G₂/M-Arrest).



Ergebnisse

Abbildung 15: Zellzyklusanalyse durch PI-Färbung

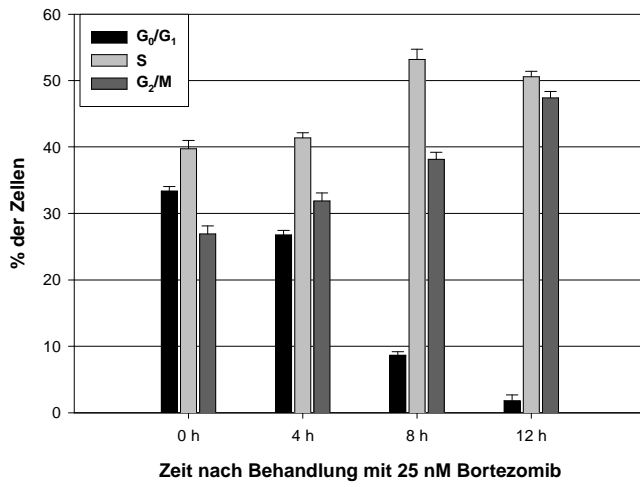
Repräsentative Histogramme für Granta 519 Zellen initial (A), sowie 4 Stunden (B) 8 Stunden (C) und 12 Stunden (D) nach Exposition mit 25 nM Bortezomib. Der erste Peak repräsentiert Zellen in der G₀/G₁-Phase, der zweite Peak Zellen, die sich in der G₂/M Phase des Zellzyklus befinden. Dazwischen liegen die Zellen der S-Phase. Deutlich erkennbar ist ein Anstieg von Zellen im Sub-G₁-Bereich sowie eine zunehmende Verschiebung des Zellzyklus zur G₂/M Phase (G₂/M-Arrest).

Veränderungen im Zellzyklusprofil zeigten sich bereits 4 bzw. 8 Stunden nach Exposition mit dem Proteasom-Inhibitor und konnten in allen Mantelzelllymphom-Zelllinien beobachtet werden. Zellzyklusalterationen treten somit sehr früh nach Inhibitorgabe auf. Die stärksten Verschiebungen zeigten sich in HBL-2 Zellen mit einer Zunahme der G₂/M-Phase von 13,6% auf 27,9% und einem Abfall der G₀/G₁-Phase von 34,9% auf 15,7%. Auch in Granta 519 zeigten sich deutliche Veränderungen im Sinne eines G₂/M-Arrests. Nur geringen Einfluss auf den Zellzyklus hatte die Gabe von Bortezomib auf NCEB-1 und besonders auf Rec-1 Zellen. Interessanterweise scheint die Induktion eines Zellzyklusarrests in Zusammenhang mit der antiproliferativen Empfindlichkeit der Zellen auf Bortezomib zu stehen. Während die empfindlichen Zelllinien (Granta 519, HBL-2) deutliche Veränderungen der Zellzyklusphasen (Abnahme der Zellen in der G₀/G₁-Phase und Zunahme an Zellen in der G₂/M-Phase) zeigen, sind die Veränderungen in NCEB-1 oder Rec-1 deutlich weniger ausgeprägt. Einzige Ausnahme bildet die JeKo-1 Zelllinie, in der zwar eine deutliche Reduktion der G₀/G₁-Phase beobachtet wurde, allerdings nur eine geringe Zunahme der G₂/M-Phase.

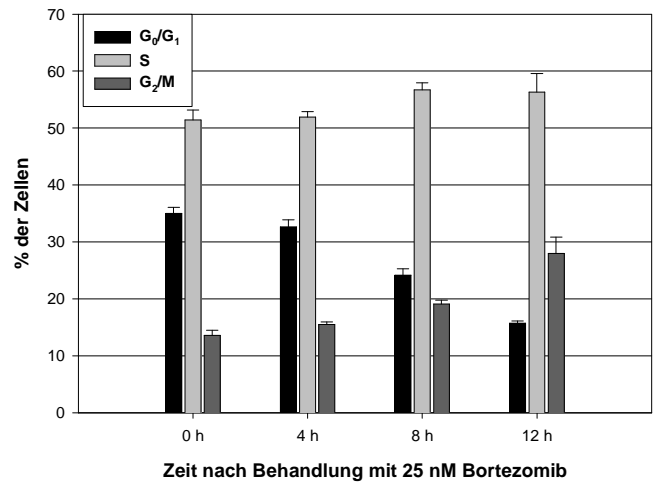
Um zu klären, ob der G₂/M-Arrest ein spezifisches Ereignis in MCL ist, wurden auch die Kontrollzelllinien mit Bortezomib behandelt und anschließend mittels PI-Färbung analysiert. Auch hier bestätigte sich der bereits bei den MCL zu beobachtende G₂/M-Arrest in Abhängigkeit von der Empfindlichkeit der Zellen auf den Inhibitor. In Karpas 422 kam es zu einer deutlichen Verschiebung zur G₂/M-Phase, während dieser Effekt bei Jurkat deutlich geringer ausfiel.

Ergebnisse

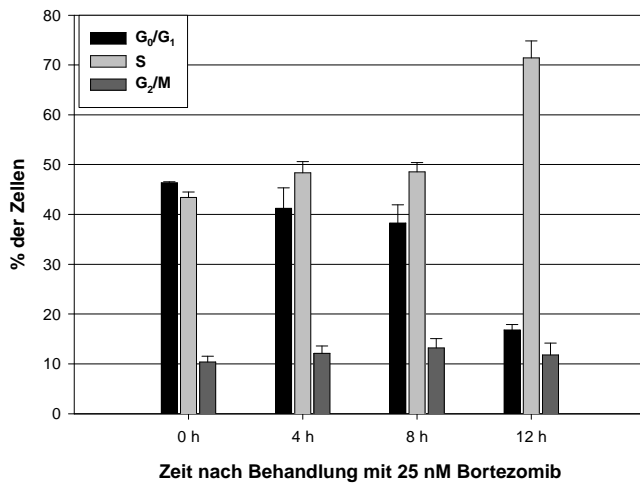
A (Granta 519)



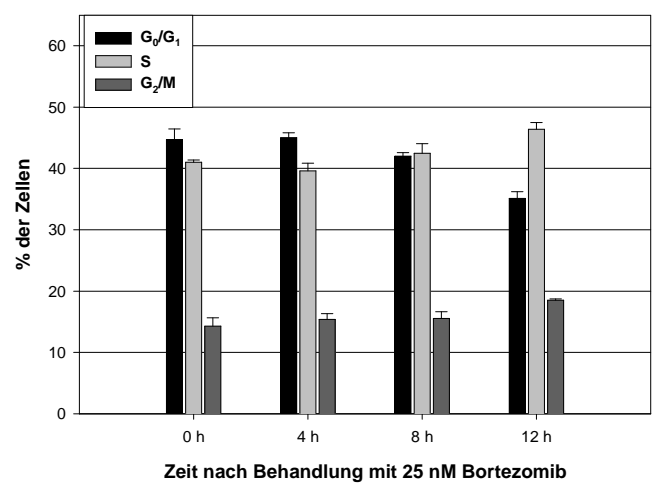
B (HBL-2)



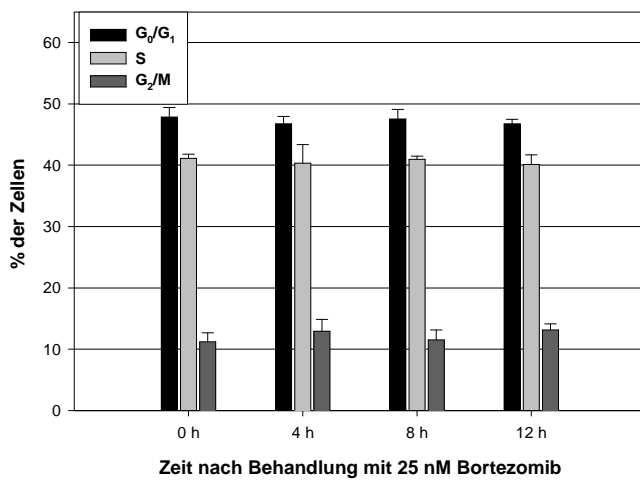
C (JeKo-1)



D (NCEB-1)

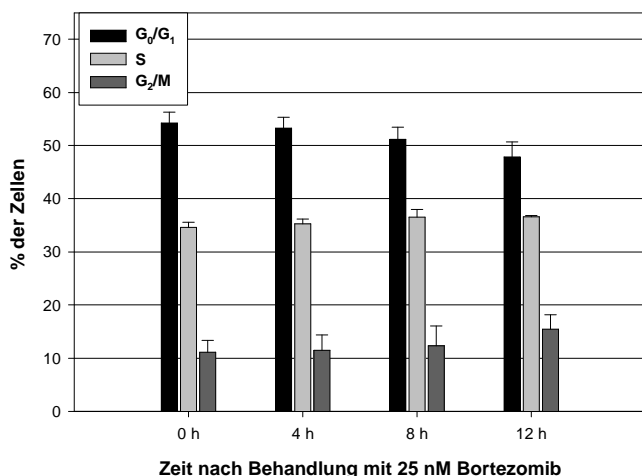


E (Rec-1)



Ergebnisse

F (Jurkat)



G (Karpas 422)

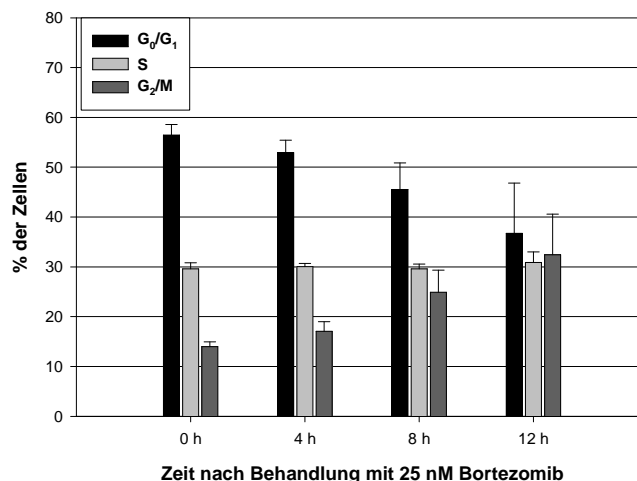


Abbildung 16: Zellzyklusanalysen durch PI-Färbung

Zellzyklusanalyse innerhalb der ersten 12 Stunden nach Exposition mit 25 nM Bortezomib in Mantelzelllymphom- (A bis E) und Kontrollzelllinien (F und G). Gezeigt werden jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

3.4 Kombination von Bortezomib mit konventionellen Chemotherapeutika

3.4.1 Antiproliferative Wirksamkeit konventioneller Chemotherapeutika

Die Standardtherapie des MCL besteht derzeit in einer Kombination aus Zytostatika und dem anti-CD20 Antikörper Rituximab, wie in den Schemata R-CHOP oder R-FCM. Durch Einsatz des Proteasom-Inhibitors Bortezomib, allein oder in Kombination, könnten die therapeutischen Optionen ergänzt werden. Anhand der MCL- und Kontrollzelllinien sollte gezeigt werden, inwieweit die Kombination aus Bortezomib mit unterschiedlichen konventionellen Chemotherapeutika *in vitro* einen Vorteil gegenüber der Anwendung von Einzelsubstanzen besitzen, d.h. ob synergistische Effekte zwischen verschiedenen Substanzen bestehen. Hierzu wurden die Zellen jeweils mit den Einzelsubstanzen und einer fixen Kombination aus Bortezomib und Zytostatikum inkubiert. Um festzustellen, ob die Sequenz der Substanzen Einfluss auf deren Interaktion hat, wurden Koinkubationen über 24 Stunden und die sequenzielle Verabreichung der Substanzen verglichen. Hierzu wurden zusätzlich die IC₅₀-Werte aller Monosubstanzen nach zwölfstündiger

Ergebnisse

Inkubation bestimmt. Zur Analyse der Interaktion zwischen den Einzelsubstanzen wurde der IC_{50} -Wert für jede Kombination und Sequenz bestimmt. Die in Kombination mit Bortezomib zur Anwendung gekommenen Chemotherapeutika waren die Nucleosidanaloga Cytosin-Arabinosid (AraC) (0-25 $\mu\text{g/ml}$), Fludarabin (0-5 $\mu\text{g/ml}$) und Gemcitabin (0-5 $\mu\text{g/ml}$) sowie der Topoisomerasehemmer Mitoxantron (0-5 $\mu\text{g/ml}$). Die IC_{50} -Werte nach zwölf- und 24-stündiger Inkubation mittels WST-1 Assay sind in Abbildung 17 dargestellt.

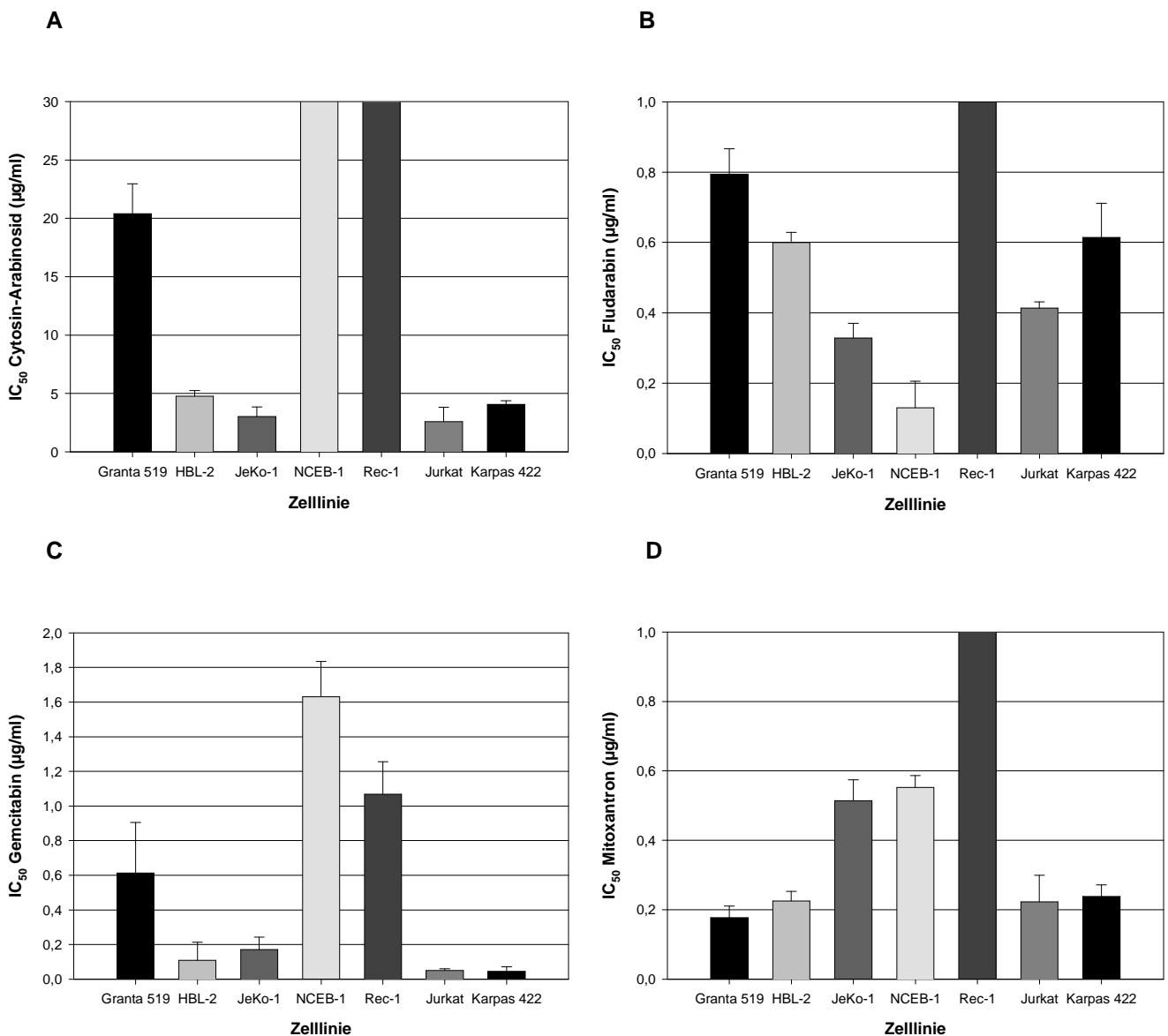


Abbildung 17: IC_{50} -Werte konventioneller Chemotherapeutika

Mantelzelllymphom- und Kontrollzelllinien wurden über 24 Stunden mit ansteigenden Dosen verschiedener Chemotherapeutika inkubiert und mit dem WST-1 Assay die IC_{50} -Werte bestimmt. (A) Cytosin-Arabinosid (0-25 $\mu\text{g/ml}$), (B) Fludarabin (0-5 $\mu\text{g/ml}$), (C) Gemcitabin (0-5 $\mu\text{g/ml}$) (D) Mitoxantron (0-5 $\mu\text{g/ml}$). Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Ergebnisse

Die Empfindlichkeit der Zelllinien auf konventionelle Chemotherapeutika ist mit der Empfindlichkeit auf Bortezomib vergleichbar. So weisen NCEB-1 und Rec-1 in den getesteten Dosisbereichen die höchsten IC_{50} -Werte auf, allerdings bestehen durchaus Unterschiede zwischen den einzelnen Zytostatika. So ist NCEB-1 auf die Behandlung mit Fludarabin am empfindlichsten. Für AraC wird kein IC_{50} -Wert für beide Zelllinien erreicht, dies gilt auch für Rec-1 Zellen bei Fludarabin und Mitoxantron. Somit sind diese Zellen sowohl nach Bortezomib-Exposition als auch nach Zytostatika-Behandlung am unempfindlichsten. Interessanterweise zeigt Rec-1 auf Bortezomib eine intermediäre Empfindlichkeit, während es gegenüber konventionellen Chemotherapeutika weitgehend unempfindlich ist, was darauf hinweist, dass Bortezomib in der Lage ist, die Chemoresistenz von Tumorzellen zu überwinden. JeKo-1 ist auch bei der Anwendung der Chemotherapeutika, mit Ausnahme von Gemcitabin und Mitoxantron die empfindlichste aller MCL-Zelllinien, Granta 519 und HBL-2 Zellen zeigen eine intermediäre Empfindlichkeit. Die Kontrollzelllinien Jurkat und Karpas 422 sind auf alle getesteten Chemotherapeutika empfindlicher, die IC_{50} -Werte liegen, mit Ausnahme von Fludarabin, niedriger als die der MCLs. Diese Unterschiede verdeutlichen die Resistenz der MCLs auf konventionelle Zytostatika.

3.4.2 Die sequentielle Kombination von Bortezomib und Cytosin-Arabinosid wirkt synergistisch bei Präinkubation mit Cytosin-Arabinosid

Um die Kombination aus Zytostatikum und Bortezomib zu evaluieren, wurden die Zelllinien in einer fixen Kombination aus Bortezomib und AraC inkubiert. Die IC_{50} -Werte wurden nicht nur für die Koinkubation beider Substanzen über 24 Stunden, sondern auch für die sequentielle Inkubation bestimmt. Jeweils eine Substanz wurde über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden inkubiert, während die andere Substanz erst nach zwölf Stunden zugefügt wurde. Die CI (IC_{50})-Werte für die Kombination aus Bortezomib und AraC zeigen starken Synergismus in allen MCL-Zelllinien bei Präinkubation mit AraC für 12 Stunden, die CI (IC_{50})-Werte lagen zwischen 0,17 ($\pm 0,05$) und 0,62 ($\pm 0,04$). Ein synergistischer Effekt liegt bei $CI < 0,7$ vor (s. Methoden). Ein synergistischer Effekt für diese Kombination wurde auch bei Karpas 422 ($0,15 \pm 0,16$), nicht jedoch bei Jurkat ($1,11 \pm 0,34$) nachgewiesen. Bei

Ergebnisse

Koinkubation beider Substanzen lässt sich nur in Jurkat und Rec-1 ein Synergismus feststellen, während sich bei allen anderen Zellen additive Effekte zeigen. Ein additiver Effekt liegt bei $0,7 < C_i < 1,3$ vor. Interessanterweise bestehen bei der Präinkubation mit Bortezomib z.T. ausgeprägte antagonistische Effekte, die speziell in den MCL-Zelllinien auftraten (HBL-2, JeKo-1, NCEB-1) und durch C_i (IC_{50}) Werte von bis zu $2,83 (\pm 0,57)$ charakterisiert sind.

Tabelle 5: C_i (IC_{50}) Werte für die Kombination von Bortezomib und AraC

Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, signifikant synergistische Werte sind fett gedruckt

Zelllinie	Bortezomib (24h)+ AraC (12h)	Bortezomib (24h)+ AraC (24h)	Bortezomib (12h)+ AraC (24h)
Granta 519	0,55($\pm 0,21$)	0,88($\pm 0,30$)	0,50($\pm 0,08$)
HBL-2	2,83($\pm 0,57$)	0,79($\pm 0,18$)	0,17($\pm 0,05$)
JeKo-1	1,60($\pm 0,81$)	0,64($\pm 0,56$)	0,23($\pm 0,05$)
NCEB-1	0,62($\pm 0,23$)	0,15($\pm 0,56$)	0,46($\pm 0,22$)
Rec-1	1,32($\pm 0,34$)	0,41($\pm 0,23$)	0,62($\pm 0,04$)
Jurkat	1,52($\pm 0,26$)	0,39($\pm 0,23$)	1,11($\pm 0,34$)
Karpas 422	2,08($\pm 0,51$)	1,15($\pm 0,17$)	0,15($\pm 0,16$)

3.4.3 Überwiegend additive oder antagonistische Effekte bei der Kombination von Bortezomib mit Fludarabin, Gemcitabin oder Mitoxantron

Analog zur Kombination von Bortezomib und AraC wurden auch die anderen Zytostatika auf synergistische Effekte mit Bortezomib untersucht. Hierbei zeigte sich kein einheitliches Bild. Die Kombination von Bortezomib und Fludarabin führte bei Präinkubation mit Fludarabin sowie bei Koinkubation zu synergistischen oder additiven Effekten, die Präinkubation mit Bortezomib wies auf additive oder antagonistische Interaktionen zwischen den Substanzen hin. Sehr heterogene Ergebnisse wurden bei der Kombination aus Bortezomib und Gemcitabin beobachtet. Zwar war die Koinkubation mit Bortezomib in 2 von 5 MCL-Zelllinien synergistisch, allerdings zeigte sich bei Koinkubation sowie Präinkubation mit Bortezomib ein ausgeprägter Antagonismus mit C_i (IC_{50}) Werten von bis zu $7,05 (\pm 1,34)$. Für Mitoxantron wurde in keiner der Kombinationen ein Synergismus nachgewiesen, bei Präinkubation mit Bortezomib bestanden additive Effekte, die Koinkubation und die Präinkubation mit Mitoxantron führte mehrheitlich zu antagonistischer Interaktion.

Ergebnisse

Tabelle 6: Ci (IC₅₀) Werte für die Kombination von Bortezomib und Fludarabin

Mittelwert ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, signifikant synergistische Werte sind fett gedruckt

Zelllinie	Bortezomib (24h)+ Fludarabin (12h)	Bortezomib (24h)+ Fludarabin (24h)	Bortezomib (12h)+ Fludarabin (24h)
Granta 519	1,05(±0,23)	0,85(±0,22)	1,01(±0,23)
HBL-2	1,55(±0,28)	1,50(±0,22)	0,89(±0,13)
JeKo-1	3,65(±0,46)	1,88(±0,28)	0,41(±0,09)
NCEB-1	1,00(±0,20)	0,57(±0,10)	0,86(±0,71)
Rec-1	2,38(±0,91)	1,41(±0,38)	1,97(±0,56)
Jurkat	1,23(±0,27)	1,06(±0,23)	0,86(±0,01)
Karpas 422	2,55(±0,53)	0,83(±0,15)	0,66(±0,39)

Tabelle 7: Ci (IC₅₀) Werte für die Kombination von Bortezomib und Gemcitabin

Mittelwert ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, signifikant synergistische Werte sind fett gedruckt

Zelllinie	Bortezomib (24h)+ Gemcitabin (12h)	Bortezomib (24h)+ Gemcitabin (24h)	Bortezomib (12h)+ Gemcitabin (24h)
Granta 519	0,85(±0,30)	0,59(±0,23)	0,17(±0,04)
HBL-2	1,55(±1,4)	3,71(±1,89)	1,46(±0,40)
JeKo-1	3,65(±0,86)	3,86(±2,84)	1,55(±0,27)
NCEB-1	0,30(±0,03)	4,62(±0,91)	7,05(±1,34)
Rec-1	0,53(±0,41)	1,78(±0,31)	2,12(±0,69)
Jurkat	0,25(±0,06)	0,35(±0,71)	0,29(±0,08)
Karpas 422	0,74(±0,23)	0,63(±0,10)	1,53(±0,26)

Tabelle 8: Ci (IC₅₀) Werte für die Kombination von Bortezomib und Mitoxantron

Mittelwert ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, signifikant synergistische Werte sind fett gedruckt

Zelllinie	Bortezomib (24h)+ Mitoxantron (12h)	Bortezomib (24h)+ Mitoxantron (24h)	Bortezomib (12h)+ Mitoxantron (24h)
Granta 519	0,61(±0,19)	2,09(±0,87)	1,21(±0,49)
HBL-2	0,92(±0,18)	1,47(±0,38)	1,57(±0,53)
JeKo-1	0,69(±0,25)	2,20(±0,64)	1,69(±0,34)
NCEB-1	1,74(±0,38)	1,69(±0,34)	1,18(±0,15)
Rec-1	0,54(±0,29)	0,70(±0,2)	1,35(±0,22)
Jurkat	1,14(±0,72)	1,56(±0,81)	1,76(±0,68)
Karpas 422	0,93(±0,47)	1,92(±0,56)	1,84(±0,72)

4. Diskussion

4.1 Bortezomib zeigt hohe Wirksamkeit gegen Mantelzelllymphom Zelllinien

Das Mantelzelllymphom ist ein aggressives B-NHL, welches durch die schlechteste Langzeitprognose aller Lymphomsubtypen und eine ausgeprägte Resistenz gegenüber konventionellen Chemotherapeutika charakterisiert ist (Bosch et al., 1998; Bertoni et al., 2004). Der klinische Verlauf zeigt in fortgeschrittenen Stadien eine kontinuierliche Progression und ein medianes Überleben von drei Jahren. Zwar können durch eine kombinierte Immunochemotherapie mit Rituximab (R-CHOP, R-FCM oder R-MCP) ein höheres Gesamtansprechen und eine Verlängerung des Gesamtüberlebens erzielt werden, doch eine Heilung ist hierdurch nicht möglich (Dreyling et al., 2007). Die allogene Knochenmarktransplantation ist bisher der einzige potentiell kurative Therapieansatz. Angesichts dieser Situation sind neue Therapieansätze, die in Kombination mit bisher bewährten Therapieschemata das therapeutische Spektrum erweitern und zu einer Verbesserung von Prognose und Lebensqualität der Patienten führen dringend erforderlich. Ein Ansatz ist die Proteasominhibition durch Bortezomib. Bortezomib ist die erste Substanz einer neuen Klasse von Medikamenten die als zellulären Angriffspunkt zielgerichtet das Proteasom hemmen und für den Einsatz in klinischen Studien zugelassen wurde. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigt Bortezomib ausgeprägte antitumorale Aktivität, was die Rationale für eingehendere Untersuchungen im präklinischen wie im klinischen Einsatz bildet.

Zunächst konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass Bortezomib eine hohe Wirksamkeit gegen MCL-Zelllinien zeigt. Nach 72-stündiger Inkubation mit 25 nM lag die Zahl der lebenden Zellen zwischen 0% bis 75% der Zahl der unbehandelten Zellen. In klinisch erreichbarer Dosierung kann in allen Zelllinien die Proliferation effektiv gehemmt werden. Unterschiede zwischen MCL- und Kontrollzelllinien ließen sich hierbei nicht feststellen. Allerdings ist festzuhalten, dass NCEB-1 mit Abstand am wenigsten auf die Behandlung mit Bortezomib anspricht und die Zahl der lebenden Zellen nach Inkubation über 72 Stunden um das 11-fache höher liegt als die Zellzahl bei der am zweitunempfindlichsten Zelllinie Rec-1. Diese

Diskussion

Ergebnisse konnten durch Bestimmung der IC_{50} -Werte nach 24-stündiger Inkubation bestätigt werden. Auch hier zeigte sich NCEB-1 mit $44,5 \pm 9,1$ nM als deutlich resistenter als die anderen getesteten Zelllinien, deren Werte zwischen $14,8 \pm 1,3$ nM und $28,2 \pm 0,4$ nM lagen. Die IC_{50} -Werte der Kontrollzelllinien ($20,3 \pm 2,2$ nM und $24,4 \pm 0,3$ nM) lagen Bereich der MCLs. Durchflußzytometrisch konnte eine Apoptoseinduktion durch Bortezomib gezeigt werden. Abhängig von der Zelllinie führte Bortezomib nach zwölf- bzw. 24-stündiger Inkubation zu einem Anteil an apoptotischen Zellen zwischen 17,6% und 50,0% bzw. 24,7% und 77,9%. Die Ergebnisse bestätigen somit Beobachtungen von Pham et al., die in den Mantelzelllymphom Zelllinien DB und Mino die antiproliferative und apoptose-induzierende Wirkung von Bortezomib demonstrierten. Die höhere Rate an apoptotischen Zellen bei Pham et al. ist vor allem auf die in dieser Arbeit höhere Dosis von 50nM Bortezomib zurückzuführen. Ein unterschiedliches Ansprechen der MCL-Zelllinien auf Bortezomib konnte in einer Arbeit von Perez-Galan et al. bestätigt werden. Von den untersuchten Zelllinien war Rec-1 mit einer LD_{50} nach 20 Stunden von $60,1 \pm 1,6$ nM deutlich weniger empfindlich als Granta 519 ($19,4 \pm 1,8$ nM) und JeKo-1 ($26,6 \pm 2,2$ nM). Die in der Arbeit publizierten deutlich höheren LD_{50} -Werte kommen durch die geringer Inkubationsdauer und die Bestimmung der LD, welche sich auf eine apoptoseinduzierende Dosis bezieht zustande.

Keine Korrelation konnte zwischen Sensibilität auf Bortezomib und Mutationen in Tumorsuppressorgen gefunden werden. So sind Granta 519 und HBL-2 ähnlich empfindlich auf Bortezomib, obwohl Granta 519 den p53 Wildtyp aufweist und p53 bei HBL-2 mutiert ist. Ähnlich verhält es sich bei den unempfindlichsten Zelllinien NCEB-1 und Rec-1, wo p53 bei NCEB-1 mutiert ist, während bei Rec-1 der Wildtyp vorliegt. Eine mögliche Erklärung für die Unempfindlichkeit von NCEB-1 könnte der Nachweis von Mauschromosomen in NCEB-1 sein (Camps et al., 2006). Die Expression muriner Genen wie bcl-2 in einer humanen Zelllinie könnte zur stärkeren Resistenz dieser Zelllinie gegenüber unterschiedlicher zytotoxischer Substanzen führen. Der weitere Einsatz der Zelllinie NCEB-1 als geeignetes Modell für MCLs erscheint vor dem Hintergrund dieser Beobachtung fragwürdig.

Die Rolle des Proteasoms in der Onkogenese, die Mechanismen, über die Bortezomib antiproliferativ wirksam ist und die zellulären Ereignisse, die eine Inhibition des Proteasoms nach sich zieht sind nicht abschließend geklärt. Tumoren können sowohl durch Stabilisierung von Onkoproteinen als auch durch

Diskussion

Destabilisierung von Tumorsuppressorgenen entstehen. Das Ubiquitin-Proteasom-System spielt eine entscheidende Rolle in der zellulären Proteinhomöostase und das Proteasom scheint bei der Entstehung einer Vielzahl von Tumoren von großer Bedeutung zu sein. Proteine, die über das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert werden sind beispielsweise die Tumorsuppressoren *p53* und *p27^{KIP}*, die Oberflächenrezeptoren für Wachstumsfaktoren EGFR (epidermal growth factor Receptor) oder TGF- β R (transformin growth factor- β Receptor) sowie Regulatoren des Zellzyklus und der Transkription (Burger et al., 2004). Ein Zusammenhang zwischen der Aktivität des Proteasoms und der Pathogenese von Tumoren wurde bereits 1990 von Kumatori et al. in Leukämiezellen und 1991 von Kanayama et al. in Nierenkarzinomzellen beschreiben. Eine Arbeit von Dutaud et al. aus 2001 untersuchte mittels eines ELISA die Plasmaaktivität des 20S Proteasoms bei Gesunden im Vergleich zur Aktivität bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), M. Hodgkin, chronisch myeloproliferativem Syndrom und soliden Tumoren. Hierbei zeigte sich, dass die Plasmaaktivität des 20S Proteasoms bei Erkrankten im Vergleich zu Gesunden deutlich erhöht war, bei soliden Tumoren um bis zu 1200 Prozent. Zudem ließen sich bei Patienten mit einer CLL erhöhte Werte während einer akuten Krankheitsphase und erniedrigte Werte während einer Therapie nachweisen. Viele Substrate des Proteasoms sind an Signaltransduktionswegen beteiligt, die in Tumorerkrankungen dysreguliert sind. Während die Zahl an bekannten Tumor-assoziierten Proteinen, die ubiquitiniert und dann dem Abbau im Proteasom zugeführt werden sehr groß ist, ist nur wenig bekannt über die Rolle der einzelnen Ubiquitin-konjugierenden Enzyme in der Pathogenese von Tumoren (Burger et al., 2004). Eine Beteiligung des E1 Enzyms an der Entstehung von Tumoren konnte nicht nachgewiesen werden, ein E2 Enzym (UbcH10) sowie mehrere E3 Ligasen wurden auf ihren Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren hin untersucht. Die RNA-Expression von E2 UbcH10 in normalem Gewebe zeigte extrem niedrige Werte, während die RNA-Expression in Tumoren von Lunge, Magen, Uterus oder in Blasenkarzinomen hoch war (Okamoto et al., 2003).

Ein wichtiges Beispiel für ein Protein, das eine entscheidende Rolle in vielen Tumoren spielt und von einer substrat-spezifischen E3 Ubiquitin-Ligase reguliert wird ist *p53*. Als Tumorsuppressorprotein kurzer Halbwertszeit ist *p53* in geringen Mengen in normalen eukaryotischen Zellen vorhanden. Zellulärer Stress, durch Chemikalien oder Bestrahlung verursachte DNA-Schäden, Hypoxie oder die Aktivierung von

Diskussion

Onkogenen führen zur Stabilisierung und Akkumulation von p53. Abhängig von Situation und Grad der Schädigung kann über p53 ein Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur, Differenzierung, Seneszenz oder Apoptose reguliert werden (Chène, 2003). In etwa 50% aller menschlichen Tumore lassen sich Mutationen in p53 nachweisen, und eine große Zahl an Tumoren ist assoziiert mit Alterationen von positiven oder negativen Regulatoren von p53. Zwei E3 Ligasen, die RING-type E3 Ligase MDM2 und die HECT-type E3 Ligase E6-AP können den Abbau von p53 durch das Proteasom bewirken (Burger et al., 2004). Wildtyp p53 fördert die Expression von *MDM2*, welches wiederum p53 ubiquitiniert und so einem schnellen Abbau durch das Proteasom zuführt was zu einem effizienten Regelkreis führt (Abb. 18). Zudem bindet MDM2 an die transkriptionsaktivierende Domäne von p53 und blockiert so dessen antiproliferative Wirkung (Haupt et al., 1997). Daher stellt die Überexpression von *MDM2* eine Alternative zur Mutation oder Deletion von p53 in der Pathogenese von Tumoren dar (Yang et al., 2004). Eine Überexpression von *MDM2* durch Genamplifikation wird vor allem bei Weichgewebssarkomen und Gliomen beschrieben, Überexpression durch Alterationen von Transkription oder Translation zeigen sich bei akuten lymphatischen Leukämien (ALL), Melanomen und Mammakarzinomen (Burger et al., 2004). Die Hemmung des Proteasoms in Tumoren, die *MDM2* überexprimieren und bei denen daher p53 trotz fehlender Mutation inaktiv ist, könnte einen wirkungsvollen Ansatz zur Reaktivierung von p53 und zur konsekutiven Induktion von Apoptose darstellen.

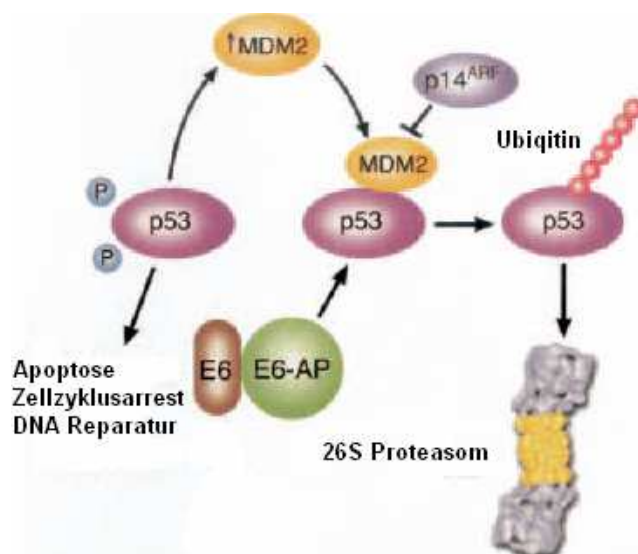


Abbildung 18:
Ubiquitinierungspaths von p53

In normalen Zellen ist die Halbwertszeit von p53 unter der Kontrolle der E3 Ligase MDM2. Genotoxische Stimuli induzieren den Ubiquitin-vermittelten Abbau von MDM2, um p53 zu aktivieren. Zellstress aktiviert p53 auch durch Phosphorylierung (modifiziert nach Mani et al., 2005).

Eine andere HECT-type E3 Ligase die sich als wichtig in der Entstehung von verschiedenen Tumoren erwiesen hat ist Smurf2 (Smad ubiquitination regulatory

Diskussion

factor-2). Smurf2 steuert die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von R-Smads und dem TGF- β Rezeptor Komplex, die zelluläre Differenzierung, Wachstum und Apoptose regulieren (Zhang et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass eine starke Expression von Smurf2 mit einer schlechten Prognose beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus korreliert (Fukuchi et al., 2002). Auch RING-type E3 Ligasen konnte eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese nachgewiesen werden, so beispielsweise der E3 Ligase BRCA-1 in der Entstehung von Mammakarzinomen (Burger et al., 2004). Zusammengefasst weisen die Arbeiten darauf hin, dass Tumorzellen einen höheren Grad an Proteolyse betreiben, was sie dazu befähigt, die Reparaturantwort normaler Zellen besser zu bewältigen und den Abbau von Tumorsuppressorproteinen oder die Aktivierung von Protoonkogenen erleichtert (Glickman et al., 2002). Abbildung 19 fasst die unterschiedlichen Wirkungen der E3 Ligasen in Tumorzellen zusammen.

Über die Regulation des Zellzyklus ist das Proteasom an einem anderen wichtigen Entstehungsmechanismus von Tumoren beteiligt. In eukaryotischen Zellen wird das Fortschreiten des Zellzyklus über CDK Komplexe reguliert. Die CDK Aktivität wird wiederum durch Cycline gesteuert, die in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus aktiv sind (King et al., 1996). Neben der Bindung an ein passendes Cyclin beinhaltet die Aktivierung von CDKs auch die Dephosphorylierung durch ein spezifisches Mitglied der CDC25-Phosphatase Familie. Das Zusammenspiel von CDKs, Cyclinen und CDC25 ist komplex reguliert und beinhaltet verschiedene Rückkopplungsschleifen und die Aktivität von CDK Inhibitoren wie p21^{WAF1} und p27^{KIP1}. Der Ubiquitin-Proteasom-Signaltransduktionsweg ist sowohl in den schnellen Umsatz von Cyclinen als auch in den Abbau von CDK Inhibitoren involviert (Adams et al., 2004).

Diskussion

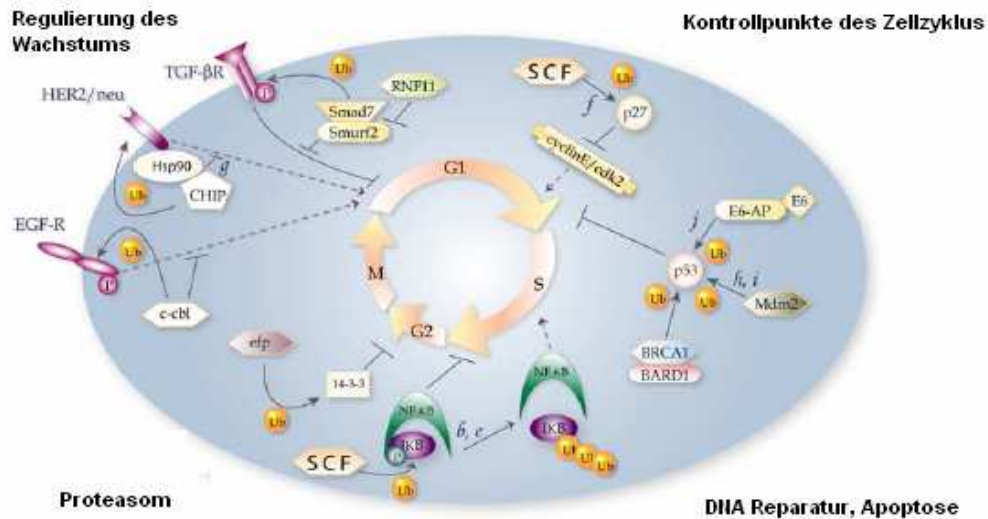


Abbildung 19: E3 Ligasen und ihre Substrate in Tumorzellen
(modifiziert nach Burger et al., 2004)

In vitro und *in vivo* konnten gezeigt werden, dass $p27^{KIP}$ in ruhenden Zellen in weitaus geringerem Ausmaß in ubiquitinierte Form vorliegt als in proliferierenden Zellen (Shirane et al., 1999). Das Proteasom wurde mit der Regulierung der Stabilität von CDC25A, B und C während des Zellzyklus in Zusammenhang gebracht, deren geordneter Abbau für das Zellwachstum erforderlich ist. Daher könnte die Hemmung des proteasomalen Abbaus dieser Regulationsmoleküle das Zellwachstum bremsen oder hemmen (Adams, 2004). Beim MCL konnte in einer Studie in einem Großteil der untersuchten Patientenproben eine Verminderung von $p27^{KIP}$ auf Proteinebene bei normaler $p27^{KIP}$ Genexpression nachgewiesen werden (Lim et al., 2002). Dieser Verlust von $p27^{KIP}$ könnte durch eine vermehrte Akkumulation von Skp2 zustande kommen, einer Komponente der $p27^{KIP}$ E3 Ubiquitin Ligase. Ein hoher Gehalt an Skp2 korreliert direkt mit einer hohen E3 Aktivität und folglich mit einem stärkeren Abbau des Zielproteins $p27^{KIP}$. In blastoiden Mantelzelllymphomen ist ein erhöhter Gehalt an Skp 2 mit niedrigem $p27^{KIP}$ assoziiert, was darauf hinweist, dass der stärkere Abbau von $p27^{KIP}$ durch das Proteasom zu einem aggressiverem Phänotyp beiträgt (O'Connor, 2005). Ein Anstieg von $p21^{WAF1}$, $p27^{KIP}$ und p53 nach Bortezomib Exposition ließ sich in mehreren Arbeiten nachweisen und war hierbei jeweils mit Apoptoseinduktion assoziiert (Pham et al., 2003; Perez-Galan et al., 2006). Somit ist die Rekrutierung von $p21^{WAF1}$, $p27^{KIP}$ und p53 ein bedeutender Mechanismus der zytotoxischen Wirkung von Bortezomib. Es kann diese jedoch nicht allein erklären, da - wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde - Bortezomib auch in Zellen mit

Diskussion

mutiertem oder delektiertem p53 wirksam ist. Die Akkumulation von CDK-Inhibitoren könnte des Weiteren die Veränderungen im Zellzyklusprofil nach Proteasominhibition erklären. Ein G₂/M-Arrest nach Bortezomib Behandlung wurde bereits in humanen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien beobachtet (Ling et al., 2003). Die Akkumulation von p21^{WAF1}, die auch in MCL-Zelllinien gezeigt werden konnte, scheint hierbei die entscheidende Rolle zu spielen. Dass p21 nicht nur für den G₁/S Übergang, sondern auch für die Kontrolle des G₂/M-Kontrollpunkts wichtig ist und einen G₂/M-Arrest induzieren kann, wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt (Guadagno et al., 1996; Mantel et al., 1999; Ando et al., 2001; Ling et al., 2003) und könnte somit den bei MCL-Zelllinien zu beobachtenden G₂/M-Arrest erklären.

Das Proteasom ist auch über den NF-κB Signaltransduktionsweg an der Karzinogenese beteiligt. Über den Transkriptionsfaktor NF-κB werden Gene reguliert, die bei der Steuerung von Proliferation, Apoptose, Angiogenese und Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle spielen. Die konstitutive Aktivierung von *NF-κB*, die in vielen malignen Tumoren beobachtet werden kann (Tab. 9) schützt die Zellen vor pro-apoptischen Stimuli einschließlich derer durch antitumorale Wirkstoffe (Nakanishi et al., 2005) und wurde auch bei MCL-Zelllinien beschrieben (Pham et al., 2003). Die konstitutive Überexpression von *NF-κB* scheint entscheidend bei der Entwicklung von Medikamentenresistenzen in Tumorzellen zu sein. So ist der Grad der Phosphorylierung von IκB und die Aktivität von NF-κB in Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinomzellen signifikant höher als das in Cisplatin-empfindlichen Zellen (Mabuchi et al., 2004). NF-κB wird auch als Antwort auf die Therapie mit zytotoxischen Medikamenten wie Taxanen, Vincaalkaloiden oder Topoisomeraseinhibitoren aktiviert. So führt der Topoisomeraseinhibitor Doxorubicin in HeLa Zellen durch Mobilisierung und Stimulierung des IKK Komplexes zur Aktivierung von NF-κB und dessen Zielgenen, die Expression eines super-repressor IκBα Moleküls sensibilisierte die HeLa Zellen für die apoptotische Wirkung von Medikamenten (Bottero et al., 2001). Antitumorale Medikamente aktivieren somit gleichzeitig verschiedene Signaltransduktionswege die hemmend oder fördernd auf Mechanismen des Zelltods wirken. Eine Modulation der Balance zwischen pro- und anti-apoptischen Signalen könnte eine neue Strategie zur Verbesserung der Wirksamkeit von bestehenden Chemotherapeutika darstellen (Nakanishi et al., 2005).

Diskussion

Tabelle 9: Konstitutive NF- κ B Aktivität in menschlichen Tumorzellen
(modifiziert nach Pacifico et al., 2006)

Tumorart	Vermuteter Mechanismus
M. Hodgkin	Konstitutive IKK Aktivität, <i>ikba</i> , <i>ikbe</i> Mutationen
Akute Lymphoblastische Leukämie	Konstitutive IKK Aktivität, <i>nfk1</i> chromosomales Rearrangement
T-Zell Leukämie	Gesteigerter I κ B α Abbau
Diffus großzelliges Lymphom	<i>c-rel</i> Amplifikation, Rearrangement, Überexpression
Follikuläres Lymphom	<i>c-rel</i> Rearrangement, Überexpression
B-NHL	<i>relA</i> , <i>nfk2</i> , <i>bcl3</i> chromosomales Rearrangement
Multiples Myelom	<i>relA</i> Aminosäureaustausch
Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals	Defekte I κ B α Aktivität
Brust	Defekte I κ B α Aktivität
Kolon	Defekte I κ B α Aktivität
Ovar	Defekte I κ B α Aktivität
Pankreas	Defekte I κ B α Aktivität
Schilddrüse	Defekte I κ B α Aktivität
Niere	Defekte I κ B α Aktivität
Blasenkarzinom	Defekte I κ B α Aktivität
Leber	Defekte I κ B α Aktivität
Prostata	Defekte I κ B α Aktivität
Astrozytom/Glioblastom	Defekte I κ B α Aktivität
Melanom	Defekte I κ B α Aktivität

Die konstitutive Aktivierung von NF- κ B kann durch genetische Alterationen der Gene für NF- κ B und I κ B oder durch uneingeschränkte IKK Aktivität bedingt sein (Rayet et al., 1999). Sowohl in soliden Tumoren wie auch in hämatologischen Neoplasien konnten chromosomale Aberrationen in Genen nachgewiesen werden, die für REL, RELA, NF- κ B1 oder NF- κ B2 codieren. Eine konstitutive Aktivierung von *NF- κ B* wurden zudem als Folge einer konstitutiven IKK Aktivität oder von Mutationen, die I κ Bs inaktivieren beschrieben (Nakanishi et al., 2005, Pacifico et al., 2006).

Die Mechanismen, über die NF- κ B auf Proliferation und Apoptose Einfluss nimmt sind vielfältig. Aktiviertes NF- κ B antagonisiert die Funktion von p53 (Webster et al., 1999). NF- κ B fördert das Überleben von Zellen durch Expression anti-apoptotischer Gene. Die codierten Proteine wirken entweder auf mitochondrialer Ebene, wie BCL-X_L oder BFL-1, die zur BCL2 Familie gehören (Karin et al., 2002), oder blockieren direkt die Aktivierung von Caspasen, wie IAP1, IAP2 und XIAP (Deveraux et al., 1999). Neben seiner anti-apoptotischen Funktion induziert NF- κ B Zellproliferation und Zellzyklusprogression durch Regulation der Expression von Wachstumsfaktoren oder Zellzyklusregulatoren wie MYC und Cyclin D1 (Rayet et al., 1999). Desweiteren induziert NF- κ B die Angiogenese in Tumoren durch Hochregulation der

Diskussion

Cyclooxygenase-2 (COX2) und NO-Synthese, sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM1 oder VCAM1, die mit Metastasierung und einer schlechten Prognose assoziiert sind (Bonizzi et al., 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass NF- κ B die Expression des *Human multidrug resistance gene 1 (MDR1)* *in vitro* aktiviert, was die Bedeutung von NF- κ B in der Resistenz gegen Zytostatika weiter untermauert (Bentires-Alj et al., 2003).

Das Ubiquitin-Proteasom-System nimmt in der Steuerung des NF- κ B Signalpfads eine bedeutende Funktion ein (Abb. 20). Wie Eingangs erwähnt, liegt NF- κ B im Zytoplasma gebunden an I κ B vor und ist somit inaktiv. Die durch die IKK vermittelte Phosphorylierung von I κ B ist die gemeinsame Endstrecke der meisten NF- κ B aktivierenden Stimuli. Die phosphorylierte Region auf I κ B ist essentieller Bestandteil einer Erkennungsregion für eine spezifische E3 Ligase die I κ B ubiquitiniert, so dass I κ B durch das Proteasom degradiert werden kann und NF- κ B in seiner aktiven Form vorliegt (Karin et al., 2000). Die wachstumsfördernden und anti-apoptotischen Effekte von NF- κ B machen es zu einem wichtigen Ziel antineoplastischer Therapien. So konnte in Multiplen Myelom-Zelllinien nach Behandlung mit Bortezomib eine Wachstumshemmung induziert werden, die mit einer Stabilisierung von I κ B und reduzierter NF- κ B Aktivität einherging (Hideshima et al., 2001). In MCL-Zelllinien führte eine Exposition mit Bortezomib zu einer Akkumulation von pI κ B α , zu einer Herabregulierung von NF- κ B und hinderte die p50- und p65-Komponenten von NF- κ B daran, in den Zellkern zu eintreten (Pham et al., 2003). Zudem konnte durch spezifische Hemmung von NF- κ B eine ähnliche Proliferationshemmung erreicht werden wie durch Bortezomib, was die wichtige Bedeutung von NF- κ B in der Pathogenese des MCL verdeutlicht und eine mögliche Erklärung für die Wirksamkeit von Bortezomib in MCL liefert.

Diskussion

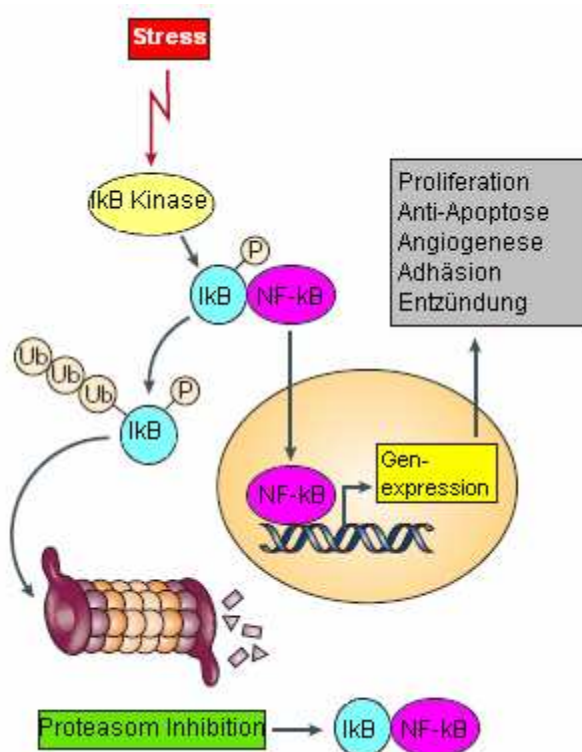


Abbildung 20: Steuerung des NF-κB Pathways über das Ubiquitin-Proteasom System

Als Antwort auf verschiedenartigen Stress, wie beispielsweise Zytostatika oder Bestrahlung wird IκB phosphoryliert und durch das Proteasom deaktiviert. Danach aktiviert NF-κB als Transkriptionsfaktor verschiedene Gene, die für Proliferation, Angiogenese, Anti-Apoptose, Adhäsion und Entzündungsmechanismen verantwortlich sind. Durch die Hemmung des Proteasoms wird die Aktivierung von NF-κB verhindert und könnte so die Empfindlichkeit der Tumorzelle für zytotoxische Substanzen steigern (modifiziert nach Adams, 2004).

Weitere Apoptose-steuernde Proteingruppen, die durch das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert werden sind Mitglieder der Bcl-2 Familie und der IAP Familie (Zhang et al., 2004). Die Proteine der Bcl-2 Familie sind vor allem für die Steuerung des mitochondrialen oder intrinsischen Apoptosepathways verantwortlich, der durch intrazellulären Stress aktiviert wird und über eine Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium zur Bildung von Apaf-1 führt, was wiederum Caspase 9 und konsekutiv Caspase 3, 6 und 7 aktiviert (Adams, 2003). Die Aktivierung von Caspasen ist die gemeinsame Endstrecke der Apoptose-Kaskade, die in einer Proteolyse der Zellen mündet. Die Bcl-2 Familie fungiert als wichtiges System, dass diverse inter- und intrazelluläre Signale integriert, um zu entscheiden, ob der Signaltransduktionsweg der Apoptose aktiviert werden soll. Mitglieder der anti-apoptotischen Subfamilie (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A1 und Bcl-B) schützen Zellen, die unterschiedlichen zytotoxischen Einflüssen ausgesetzt sind vor dem Zelltod. Im Gegensatz dazu fördern Mitglieder der Bax-ähnlichen Familie (Bax, Bak und Bok) wie auch die „BH3-only Proteine“ (Bik, Bad, Bid, Bim, Bmf, Hrk, Noxa und Puma) Apoptose (Adams et al., 2007). Über ein komplexes System werden Bax und Bak aktiviert und bilden Oligomere, die eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und eine Freisetzung von Cytochrom C auslösen. Dies führt

Diskussion

zur Aktivierung von Apaf-1, Omi und Diablo welche wiederum IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) hemmen (Cory et al., 2002; Willis et al., 2007). Verschiedenen Mitgliedern der Bcl-2 Familie wie den pro-apoptotischen Proteinen Bax oder Bid konnte eine Regulation durch das Ubiquitin-Proteasom-System nachgewiesen werden (Zhang et al., 2004), eine Proteasom-Inhibition in Tumorzellen ist mit der Akkumulation von pro-apoptotischen „BH3-only Proteinen“ Bim, Bik, Noxa oder Puma assoziiert (Adams et al., 2007). Auch in MCL-Zelllinien führt Bortezomib zu einer Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalpfads, der mit der Aktivierung von Caspasen, Alterationen des mitochondrialen Membranpotentials und der Generierung von ROS (Reactive Oxygen Species) assoziiert ist. Zudem konnte eine Akkumulation von Mcl-1, eine Konformationsänderung bei Bax und Bak und eine Hochregulierung von Noxa beobachtet werden (Perez-Galan et al., 2006). Diesem Protein wird in der Induktion von Apoptose durch Bortezomib eine herausragende Bedeutung zugeschrieben, da es die anti-apoptotische Wirkung von Mcl-1 konterkarieren kann, in dem es an Mcl-1 bindet und das pro-apoptotische Bak freisetzt (Willis et al., 2005). Noxa wurde sowohl in Bortezomib-sensiblen als auch Bortezomib-resistenten Zelllinien als Mediator der Apoptose identifiziert (Rizzatti et al., 2008). Durch Hemmung der Noxa-Expression mittels RNAi wird die Wirkung von Bortezomib auf MCL-Zelllinien deutlich abgeschwächt (Perez-Galan et al., 2006), was die herausragende Bedeutung dieses Proteins in der Apoptose-Induktion durch Bortezomib untermauert.

Zusammenfassend zeigt sich, dass das Ubiquitin-Proteasom-System in unterschiedlichster Weise an der Onkogenese beteiligt ist. Es ergeben sich eine Vielzahl an Angriffspunkten, über die mittels einer Hemmung des Proteasoms in Tumorzellen Einfluss auf Empfindlichkeit gegenüber zytotoxischer Substanzen, sowie auf Proliferation und Zelltod genommen werden kann. Die genauen Mechanismen, über die Bortezomib seine Wirkungen auf Zellen entfaltet sind jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Diskussion

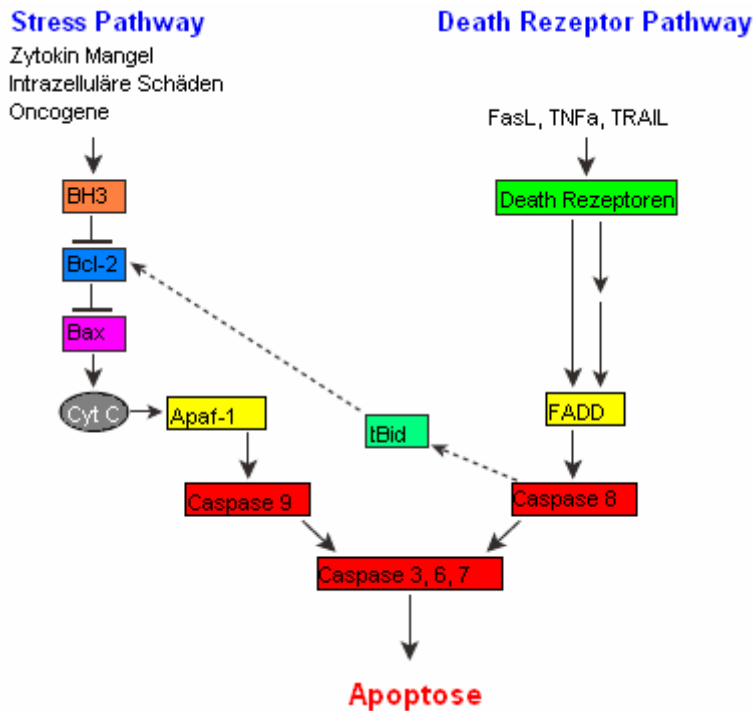


Abbildung 21: Signalpfade des Zelltods

Der Stress Pathway wird durch die „BH3-only“ Proteine ausgelöst, welche Bcl-2-ähnliche Proteine inaktivieren, die somit Bax oder Bak nicht mehr hemmen können. Bax oder Bak können die äußere Mitochondrienmembran permeabilisieren und lösen über die Freisetzung von Cytochrom C die Caspasen Kaskade aus. Beim Death Receptor Pathway wird durch Bindung eines Liganden der TNF-Familie an den entsprechenden Rezeptor Caspase 8 über Adapter Proteine wie FADD aktiviert, und somit Apoptose induziert (modifiziert nach Adams et al., 2007)

4.2 Die Kombination von Bortezomib mit anderen Substanzen könnte eine neue therapeutische Option darstellen

Proteasom-Inhibitoren steigern die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber einer Vielzahl an Zytostatika durch Herabregulierung von resistenzvermittelnden Signalpfaden. So konnten Multiple Myelom-Zellen, die resistent auf Melphalan, Mitoxantron und Doxorubicin waren mit einer subtoxischen Dosis Bortezomib sensibilisiert werden (Ma et al, 2003). Hierbei kommt der Herabregulierung von NF- κ B durch Bortezomib eine besondere Bedeutung zu, da die Therapie mit Anthracyclinen NF- κ B aktiviert, während Bortezomib diese blockiert. Ähnliche NF- κ B-betreffende Mechanismen sind auch für die chemosensibilisierende Wirkung von Bortezomib in einem Kolonkarzinom-Xenograft Modell oder für die strahlensensibilisierende Wirkung in einen Kolonkarzinom Mausmodell beschrieben worden (Cusack et al., 2001; Russo et al., 2001). Desweiteren können Proteasom-Inhibitoren Tumorzellen für DNA-schädigende Substanzen sensibilisieren, in dem sie die Transkription von Genen der DNA-Reparatur hemmen (Mimnaugh et al., 2000; Mitsiades et al., 2003).

Diskussion

Die *in vitro* Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen nicht nur die Aktivität von Bortezomib in MCL-Zelllinien, sondern demonstrieren eine gesteigerte Wirksamkeit in Kombination mit Zytostatika, hierbei in besonderem mit AraC. Interessanterweise hat die Sequenz der Administration der Substanzen einen großen Einfluss auf die Interaktion. Es zeigt sich eine deutliche Überlegenheit der Kombination aus Präinkubation mit AraC gefolgt von Bortezomib. AraC ist eine der wirkungsvollsten Substanzen in Mono- oder Kombinationstherapie von hämatologischen Malignomen inklusive des MCL (Kantarjian et al., 1983; Lefrère et al., 2002). Nach Konversion zu seinem Triphosphatderivat Ara-Cytidintriphosphat (CTP) interferiert es mit DNA-Polymerasen und wird während der DNA-Replikation in das Genom eingebaut. Hierdurch wird die strukturelle Integrität der DNA beeinträchtigt, was die Replikation zum Stillstand bringt. Dies aktiviert die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden, die je nach Ausmaß der Schädigung einen Zellzyklusarrest oder den mitochondrialen Pathway der Apoptose einleitet (Sampath et al., 2003). Der synergistische Effekt zwischen AraC und Bortezomib könnte dadurch zu Stande kommen, dass Proteasom-Inhibition in mit AraC vorbehandelten Zellen die Menge an pro-apoptotischen Molekülen des mitochondrialen Pathways weiter steigert und somit die Apoptose positiv begünstigt. Zudem wurde in spätapoptotischen Zellen gezeigt, dass Effektorcaspasen drei Untereinheiten des 19S Partikels abbauen und somit die Aktivität des Proteasoms irreversibel hemmen (Sun et al., 2004). Da Bortezomib in MCL-Zellen antiproliferativ wirksam ist und Apoptose induziert, könnte durch Hemmung des Proteasoms vor AraC-Exposition die Menge an Nukleosidanalogen, die in die DNA aufgenommen wird geringer sein. Dies wird durch die Beobachtung untermauert, dass Bortezomib einen G₂/M-Arrest induziert und sich die Zellen somit zum Zeitpunkt der Exposition mit AraC überwiegend in einer Phase des Zellzyklus befinden, in dem DNA-Replikation nur in geringerem Maße stattfindet. Des Weiteren induziert Bortezomib die Akkumulation von anti-apoptotischem Mcl-1 (Perez-Galan et al., 2006), was die Wirksamkeit von AraC zusätzlich abschwächen könnte, während die Gabe von Zytostatika wie Nukleosidanaloga eine Herabregulierung von Mcl-1 induziert (Ferrer et al., 2004). Diese Beobachtungen könnten somit die Ergebnisse der Kombinationstherapie erklären, die synergistische Effekte nur für die Präinkubation und teilweise für die Koinkubation mit AraC zeigen, während bei Präinkubation mit Bortezomib nur additive oder antagonistische Wirkungen feststellbar sind. Interessanterweise zeigen sich diese sequenzabhängigen

Diskussion

synergistischen Effekte vor allem in Kombination mit AraC, nicht jedoch in Kombination mit den anderen Nukleosidanaloga Fludarabin und Gemcitabin. Eine Begründung könnte das bereits gute Ansprechen der Zelllinien auf diese Substanzen in Monotherapie sein, da sich synergistische Effekte in Kombination überwiegend in den Zelllinien zeigen, die in Monotherapie nur ein geringes oder kein Ansprechen auf die konventionellen Substanzen zeigen. Ähnlich verhält es sich bei Mitoxantron, auf das die MCL-Zellen bereits in der Monotherapie gut ansprechen. Da das Topoisomerase-II Gen in MCL ein proliferationsabhängiges Gen ist (Rosenwald et al., 2003) und in Monotherapie das Ansprechen von Zellen mit hohem Proliferationsindex besser ist (Ferrer et al., 2004), könnte das Fehlen eines synergistischen Effekts durch den Bortezomib-vermittelten G₂/M-Arrest und die ausgeprägte antiproliferative Wirkung des Proteasom-Inhibitors begründet werden.

Weitere Synergismen mit anderen Substanzen *in vitro* wurden zwischen Bortezomib und dem pan-Bcl-2-Inhibitor GX15-070 (Perez-Galan et al., 2007), dem Farnesyltransferase-Inhibitor R115777 (Rolland et al., 2008) dem mTOR-Inhibitor Rad001 (Everolimus) (Haritunians et al., 2007), Cyclophosphamid und Rituximab (Wang et al., 2008), dem Histondeacetylase-Inhibitor SAHA (Heider et al., 2008), dem BH3-only Mimetikum ABT-737 (Paoluzzi et al., 2008), MI-63, einem Inhibitor der p53 E3 Ligase HDM-2 (Jones et al., 2008), einem ERAD-Inhibitor (Wang et al., 2009) sowie dem MDM-2 Antagonisten Nutlin-3 (Tabe et al., 2009) beschrieben. Der in der vorliegenden Arbeit gefundene Synergismus zwischen Bortezomib und AraC konnte an primären MCL-Zellen von 4 MCL-Patienten bestätigt werden, hierbei zeigte sich bei Koinkubation der Substanzen in allen Patientenproben eine höhere Apoptoseinduktion als durch die Wirksamkeit der Einzelsubstanzen auf die Zellen zu erwarten gewesen wäre (Weigert et al., 2007). Auf die Wirksamkeit von Bortezomib in Kombination mit AraC weisen auch Fallreporte zweier mehrmals vorbehandelter Patienten mit rezidivierendem MCL in fortgeschrittenen Stadien hin. Während in beiden Fällen unter Monotherapie mit Bortezomib eine progrediente Lymphadenopathie bestand, kam es unter Therapie mit Bortezomib (1,5mg/m² an Tag 1 und 4) und AraC (1000mg/m² als 3h-Infusion an Tag 2 und 4) sowie der Hinzunahme von Rituximab (375mg/m² an Tag 0) zu einer deutlichen Verbesserung der Symptome sowie einem deutlichen Ansprechen bis hin zu einer partiellen Remission in einem der Fälle (Weigert et al., 2007). Auf Basis dieser Daten wurden weitere Patienten im Rahmen einer multizentrischen beobachtenden Studie mit dem

Diskussion

oben genannten Regime behandelt. Die kürzlich publizierte Langzeit-Ergebnisse zeigten bei vielfach vorbehandelten Patienten ein objektives Ansprechen in 50% der Fälle, hierunter 25% der Patienten mit einer CR (Weigert et al., 2009).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass der Proteasom-Inhibitor Bortezomib als Monosubstanz hochwirksam gegen MCL Zelllinien ist, und dass die Substanz in Kombination mit AraC sequenzabhängig einen deutlichen Synergismus zeigt. Auf dem Boden dieses Synergismus und erster klinischer Daten wird der Stellenwert von Bortezomib durch die randomisierte Phase-III-Studie des European MCL Networks *Wirksamkeit und Sicherheit einer Kombinationstherapie mit Rituximab, hochdosiertem Ara-C und Dexamethason (R-HAD) mit oder ohne Bortezomib bei Patienten mit rezidiviertem und refraktärem Mantelzell-Lymphom* weiter definiert werden und zeigen, ob die ermutigenden *in vitro* Daten klinisch bestätigt werden können und somit Prognose und Lebensqualität von MCL Patienten weiter verbessert werden können.

5. Zusammenfassung

Das Mantelzelllymphom (MCL), ein niedrigmalignes B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom, ist durch die schlechteste Prognose aller Lymphome mit einem medianen Überleben von nur 3 Jahren charakterisiert. Mit neueren Kombinationschemotherapien konnten Ansprechraten zwar gesteigert, das Gesamtüberleben der Patienten jedoch nicht verbessert werden. In der Pathogenese des MCL wurden in den letzten Jahren neue Erkenntnisse erlangt, welche das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen verbessert haben. Eine wichtige Funktion in der Steuerung von Zellzyklusprogression, Apoptose, Onkogenese und Regulation von Genexpression nimmt hierbei das Proteasom ein. Dieser hochselektive Enzymkomplex ist das wichtigste extralysosomale proteolytische System, dessen Regulation einen schnellen Abbau von Zielproteinen sicherstellt. In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vitro* Wirksamkeit des Proteasom-Inhibitors Bortezomib (BZ) in MCL- sowie hämatologischen Kontrollzelllinien untersucht. Zunächst konnte in einem initialen Zellkulturversuch die dosis- und zeitabhängige Proliferationshemmung von BZ auf MCL- sowie Kontrollzelllinien gezeigt werden. Eine genauere Quantifizierung der proliferationshemmenden Wirkung von BZ war durch den kolorimetrischen Proliferationsassay möglich, wobei sich deutliche Unterschiede in der Empfindlichkeit auf den Proteasom-Inhibitor zwischen den einzelnen MCL-Zelllinien sowie den Kontrollzelllinien zeigten. Die zytotoxische Wirkung von BZ auf MCL-Zelllinien wurde im Apoptoseassay gezeigt, wobei sich die im Proliferationsassay beobachteten Unterschiede in der Empfindlichkeit auf den Inhibitor bestätigten. Im Rahmen der Zellzyklusanalyse konnte festgestellt werden, dass die Exposition der Zellen mit BZ bereits in den ersten 12 Stunden nach Inhibitorgabe zu einem Arrest des Zellzyklus in der G2/M-Phase führt. Um synergistische Effekte zwischen BZ und konventionellen Chemotherapeutika aufdecken zu können wurden die Zellen mit den Monosubstanzen sowie in unterschiedlichen sequentiellen Kombinationen inkubiert. Synergistische Effekte wurden insbesondere bei der Präinkubation der Zellen mit Cytosin-Arabinosid beobachtet, während die Kombination von BZ mit Fludarabin, Gemcitabin oder Mitoxantron vorwiegend additive oder antagonistische Effekte erbrachte.

Die beschriebenen *in vitro* Experimente konnten die hohe Wirksamkeit von BZ gegen MCL-Zelllinien in Mono- und Kombinationstherapie demonstrieren. Der Stellenwert

Zusammenfassung

von BZ in der Therapie des MCL wird jedoch in zukünftigen klinischen Studien definiert werden müssen.

6. Literaturverzeichnis

Adachi, M., Zhang, Y., Zhao, X., Minami, T., Kawamura, R., Hinoda, Y., Imai, K. (2004). "Synergistic effect of histone deacetylase inhibitors FK228 and m-carboxycinnamic acid bis-hydroxamide with proteasome inhibitors PSI and PS-341 against gastrointestinal adenocarcinoma cells." *Clin Cancer Res* 10(11): 3853-3862.

Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A.A., Dick, L.R., Grenier, L., Klunder, J.M., Ma, Y.T., Plamondon, L., Stein, R.L. (1998). "Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids." *Bioorg Med Chem Lett* 8(4): 333-338.

Adams, J., Palombella, V.J., Sausville, E.A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D.D., Maas, J., Pien, C.S., Prakash, S., Elliott, P.J. (1999). "Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents." *Cancer Res* 59(11): 2615-2622.

Adams, J. (2003). "The proteasome: structure, function, and role in the cell." *Cancer Treat Rev* 29(Suppl 1): 3-9.

Adams, J. (2004). "The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs." *Cancer Cell* 5(5): 417-421.

Adams, J. (2004). "The proteasome: a suitable antineoplastic target." *Nat Rev Cancer* 4: 349-360.

Adams, J.M. (2003). "Ways of dying: multiple pathways to apoptosis." *Genes Dev* 17(20): 2481-2495.

Adams, J.M., Cory, S. (2007). "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy." *Oncogene* 26(9): 1324-1337.

Aghajanian, C., Soignet, S., Dizon, D.S., Pien, C.S., Adams, J., Elliott, P.J., Sabbatini, P., Miller, V., Hensley, M.L., Pezzulli, S., Canales, C., Daud, A., Spriggs, D.R. (2002). "A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies." *Clin Cancer Res* 8(8): 2505-2511.

Almond, J.B., Cohen, G.M. (2002). "The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy." *Leukemia* 16(4): 433-443.

Amin, H.M., McDonnell, T.J., Medeiros, L.J., Rassidakis, G.Z., Leventaki, V., O'Connor, S.L., Keating, M.J., Lai, R. (2003). "Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines." *Arch Pathol Lab Med* 127(4): 424-431.

An, B., Goldfarb, R.H., Siman, R., Dou, Q.P. (1998). "Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts." *Cell Death Differ* 5(12): 1062-1075.

An, J., Sun, Y.P., Adams, J., Fisher, M., Beldegrun, A., Rettig, M.B. (2003). "Drug interactions between the proteasome inhibitor bortezomib and cytotoxic chemotherapy, tumor necrosis factor (TNF) alpha, and TNF-related apoptosis-inducing ligand in prostate cancer." *Clin Cancer Res* 9(12): 4537-4545.

Literaturverzeichnis

- Ando, T., Kawabe, T., Ohara, H., Ducommun, B., Itoh, M., Okamoto, T. (2001). "Involvement of the interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage." *J Biol Chem* 276(46): 42971-42977.
- Bai, J., Sui, J., Demirjian, A., Vollmer, C.M., Marasco, W., Callery, M.P. (2005). "Predominant Bcl-XL knockdown disables antiapoptotic mechanisms: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-based triple chemotherapy overcomes chemoresistance in pancreatic cancer cells in vitro." *Cancer Res* 65(6): 2344-2352.
- Bai, J., Demirjian, A., Sui, J., Marasco, W., Callery, M.P. (2006). "Histone deacetylase inhibitor trichostatin A and proteasome inhibitor PS-341 synergistically induce apoptosis in pancreatic cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* 348(4): 1245-53.
- Bazzaro, M., Lee, M.K., Zoso, A., Stirling, W.L., Santillan, A., Shih, IeM., Roden, R.B. (2006). "Ubiquitin-proteasome system stress sensitizes ovarian cancer to proteasome inhibitor-induced apoptosis." *Cancer Res* 66(7): 3754-3763.
- Bea, S., Tort, F., Pinyol, M., Puig, X., Hernandez, L., Hernandez, S., Fernandez, P.L., van Lohuizen, M., Colomer, D., Campo, E. (2001). "BMI-1 Gene Amplification and Overexpression in Hematological Malignancies Occur Mainly in Mantle Cell Lymphomas." *Cancer Res* 61: 2409-2412.
- Belch, A., Kouroukis, C.T., Crump, M., Sehn, L., Gascoyne, R.D., Klasa, R., Powers, J., Wright, J., Eisenhauer, E.A. (2007). "A phase II study of bortezomib in mantle cell lymphoma: the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial IND.150." *Ann Oncol* 18(1): 116-121.
- Benaroudj, N., Zwickl, P., Seemuller, E., Baumeister, W., Goldberg, A., L. (2003). "ATP hydrolysis by the proteasome regulatory complex PAN serves multiple functions in protein degradation." *Mol. Cell* 11: 69-78.
- Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M.P., Bours, V. (2003). "NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells." *Oncogene* 22(1): 90-97.
- Berenson, J.R., Yang, H.H., Sadler, K., Jarutirasarn, S.G., Vescio, R.A., Mapes, R., Purner, M., Lee, S.P., Wilson, J., Morrison, B., Adams, J., Schenkein, D., Swift, R. (2006). "Phase I/II trial assessing bortezomib and melphalan combination therapy for the treatment of patients with relapsed or refractory multiple myeloma." *J Clin Oncol* 24(6): 937-944.
- Bertoni, F., Zucca, E., Cavalli, F. (2004). "Mantle Cell Lymphoma." *Curr Opin Hematol* 11: 411-418.
- Bertoni, F., Rinaldi, A., Zucca, E., Cavalli, F. (2006). "Update on the molecular biology of mantle cell lymphoma." *Hematol Oncol* 24: 22-27.
- Bloom, J., Pagano, M. (2003). "Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation." *Semin Cancer Biol* 13(1): 41-47.

Literaturverzeichnis

Bold, R.J., Virudachalam, S., McConkey, D.J. (2001). "Chemosensitization of pancreatic cancer by inhibition of the 26S proteasome." *J Surg Res* 100(1): 11-17.

Bonizzi, G., Karin, M. (2004). "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." *Trends Immunol* 25(6): 280-288.

Bosch, F., Lopez-Guillermo, A., Campo, E., Ribera, J.M., Conde, E., Piris, M.A., Vallespi, T., Woessner, S., Montserrat, E. (1998). "Mantle Cell Lymphoma: Presenting Features, Response to Therapy, and Prognostic Factors." *Cancer* 82.

Bottero, V., Busuttil, V., Loubat, A., Magné, N., Fischel, J.L., Milano, G., Peyron, J.F. (2001). "Activation of nuclear factor kappaB through the IKK complex by the topoisomerase poisons SN38 and doxorubicin: a brake to apoptosis in HeLa human carcinoma cells." *Cancer Res* 61(21): 7785-7791.

Brody, J., Ranjana, A. (2006). "Treatment of mantle cell lymphoma: Current approach and future directions." *Crit Rev Oncol Hematol*. 58: 257-265.

Burger, A.M., Seth, A.K. (2004). "The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications." *Eur J Cancer* 40(15): 2217-2229.

Campo, E., Raffeld, M., Jaffe, E.S. (1999). "Mantle-cell lymphoma." *Semin Hematol* 36: 115-27.

Camps, J., Salaverria, I., Garcia, M.J., Prat, E., Beà, S., Pole, J.C., Hernández, L., Del Rey, J., Cigudosa, J.C., Bernués, M., Caldas, C., Colomer, D., Miró, R., Campo, E. (2006). "Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines." *Leuk Res* 30(8): 923-934.

Cardoso, F., Durbecq, V., Laes, J.F., Badran, B., Lagneaux, L., Bex, F., Desmedt, C., Willard-Gallo, K., Ross, J.S., Burny, A., Piccart, M., Sotiriou, C. (2006). "Bortezomib (PS-341, Velcade) increases the efficacy of trastuzumab (Herceptin) in HER-2-positive breast cancer cells in a synergistic manner." *Mol Cancer Ther* 5(12): 3042-3051.

Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S.A., Zamzami, N., Marchetti, P., Macho, A., Kroemer, G. (1996). "Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis." *J Immunol* 157(2): 512-521.

Catley, L., Weisberg, E., Kiziltepe, T., Tai, Y.T., Hideshima, T., Neri, P., Tassone, P., Atadja, P., Chauhan, D., Munshi, N.C., Anderson, K.C. (2006). "Aggresome induction by proteasome inhibitor bortezomib and alpha-tubulin hyperacetylation by tubulin deacetylase (TDAC) inhibitor LBH589 are synergistic in myeloma cells." *Blood* 108(10): 3441-3449.

Chauhan, D., Li, G., Auclair, D., Hideshima, T., Podar, K., Mitsiades, N., Mitsiades, C., Chen, L.B., Munshi, N., Saxena, S., Anderson, K.C. (2004). "2-Methoxyestadiol and bortezomib/proteasome-inhibitor overcome dexamethasone-resistance in multiple myeloma cells by modulating Heat Shock Protein-27." *Apoptosis* 9(2): 149-155.

Literaturverzeichnis

Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., Podar, K., Shringarpure, R., Mitsiades, C., Munshi, N., Yew, P.R., Anderson, K.C. (2004). "Blockade of ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 enhances anti-myeloma activity of Bortezomib/Proteasome inhibitor PS-341." *Oncogene* 23(20): 3597-3602.

Chauhan, D., Li, G., Podar, K., Hideshima, T., Shringarpure, R., Catley, L., Mitsiades, C., Munshi, N., Tai, Y.T., Suh, N., Gribble, G.W., Honda, T., Schlossman, R., Richardson, P., Sporn, M.B., Anderson, K.C. (2004). "The bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 and triterpenoid CDDO-Im induce synergistic anti-multiple myeloma (MM) activity and overcome bortezomib resistance." *Blood* 103(8): 3158-3166.

Chauhan, D., Li, G., Podar, K., Hideshima, T., Neri, P., He, D., Mitsiades, N., Richardson, P., Chang, Y., Schindler, J., Carver, B., Anderson, K.C. (2005). "A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells." *Cancer Res* 65(18): 8350-8358.

Chène, P. (2003). "Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy." *Nat Rev Cancer*. 3(3): 102-109.

Chiarle, R., Budel, L.M., Skolnik, J., Frizzera, G., Chilosi, M., Corato, A., Pizzolo, G., Magidson, J., Montagnoli, A., Pagano, M., Maes, B., De Wolf-Peeters, C., Inghirami, G. (2000). "Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma." *Blood* 95: 619-626.

Chou, T.C., Talalay, P. (1981). "Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors." *Eur J Biochem* 115(1): 207-216.

Chou, T.C., Talalay, P. (1984). "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors." *Adv Enzyme Regul* 22: 27-55.

Codony-Servat, J., Tapia, M.A., Bosch, M., Oliva, C., Domingo-Domenech, J., Mellado, B., Rolfe, M., Ross, J.S., Gascon, P., Rovira, A., Albanell, J. (2006). "Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells." *Mol Cancer Ther* 5(3): 665-75.

Cogliatti, S.B., Bertoni, F., Zimmermann, D.R., Henz, S. Dinz, T.C., Ghielmini, M., Schmid, U. (2005). "IgVH mutations in blastoid mantle cell lymphoma characterize a subgroup with a tendency to more favourable clinical outcome." *J Pathol* 206: 320-327.

Cooper, C., Liu, G.Y., Niu, Y.L., Santos, S., Murphy, L.C., Watson, P.H. (2004). "Intermittent hypoxia induces proteasome-dependent down-regulation of estrogen receptor alpha in human breast carcinoma." *Clin Cancer Res* 10(24): 8720-8727.

Coquelle, A., Mouhamad, S., Pequignot, M.O., Braun, T., Carvalho, G., Vivet, S., Métivier, D., Castedo, M., Kroemer, G. (2006). "Cell cycle-dependent cytotoxic and

Literaturverzeichnis

cytostatic effects of bortezomib on colon carcinoma cells." *Cell Death Differ* 13(5): 873-875.

Cusack, J.C., Liu, R., Houston, M., Abendroth, K., Elliott, P.J., Adams, J., Baldwin, A.S. (2001). "Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition." *Cancer Res* 61(9): 3535-3540.

Dai, Y., Rahmani, M., Pei, X.Y., Dent, P., Grant, S. (2004). "Bortezomib and flavopiridol interact synergistically to induce apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib mesylate through both Bcr/Abl-dependent and -independent mechanisms." *Blood* 104(2): 509-518.

David, E., Sun, S.Y., Waller, E.K., Chen, J., Khuri, F.R., Lonial, S. (2005). "The combination of the farnesyl transferase inhibitor lonafarnib and the proteasome inhibitor bortezomib induces synergistic apoptosis in human myeloma cells that is associated with down-regulation of p-AKT." *Blood* 106(13): 4322-4329.

Delic, J., Masdehors, P., Omura, S., Cosset, J.M., Dumont, J., Binet, J.L., Magdelénat, H. (1998). "The proteasome inhibitor lactacystin induces apoptosis and sensitizes chemo- and radioresistant human chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to TNF-alpha-initiated apoptosis." *Br J Cancer* 77(7): 1103-1107.

Delves, P., Roitt, I.M. (2000). "The immune system: first of two parts." *N Engl J Med* 343: 37-49.

DeMartino, G.N., Slaughter, C.A. (1999). "The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms." *J. Biol. Chem.* 274: 22123-22126.

Denlinger, C.E., Keller, M.D., Mayo, M.W., Broad, R.M., Jones, D.R. (2004). "Combined proteasome and histone deacetylase inhibition in non-small cell lung cancer." *J Thorac Cardiovasc Surg* 127(4): 1078-1086.

Denlinger, C.E., Rundall, B.K., Keller, M.D., Jones, D.R. (2004). "Proteasome inhibition sensitizes non-small-cell lung cancer to gemcitabine-induced apoptosis." *Ann Thorac Surg* 78(4): 1207-1214.

Deveraux, Q.L., Reed, J.C. (1999). "IAP family proteins - suppressors of apoptosis." *Genes Dev* 13(3): 239-252.

Drexler, H.C. (1997). "Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(3): 855-860.

Drexler, H.G., MacLeod, R.A. (2002). "Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of mantle cell lymphoma." *Leuk Res* 26(9): 781-787.

Dreyling, M., Bullinger, L., Ott, G., Stilgenbauer, S., Müller-Hermelink, H.K., Bentz, M., Hiddemann, W., Döhner, H. (1997). "Alterations of the Cyclin D1/p16-pRB Pathway in Mantle Cell Lymphoma." *Cancer Res* 57: 4608-4614.

Literaturverzeichnis

Dreyling, M., Lenz, G., Hoster, E., Van Hoof, A., Gisselbrecht, C., Schmits, R., Metzner, B., Truemper, L., Reiser, M., Steinhauer, H., Boiron, J.M., Boogaerts, M.A., Aldaoud, A., Silingardi, V., Kluin-Nelemans, H.C., Hasford, J., Parwaresch, R., Unterhalt, M., Hiddemann, W. (2005). "Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network." *Blood* 105: 2677-2684.

Dreyling, M., Unterhalt, M., Weigert, O., Hiddemann, W. (2007). "Therapy of mantle cell lymphoma." *Internist (Berl)* 48(4): 382-388.

Duan, J., Friedman, J., Nottingham, L., Chen, Z., Ara, G., Van Waes, C. (2007). "Nuclear factor-kappaB p65 small interfering RNA or proteasome inhibitor bortezomib sensitizes head and neck squamous cell carcinomas to classic histone deacetylase inhibitors and novel histone deacetylase inhibitor PXD101." *Mol Cancer Ther* 6(1): 37-50.

Dutaud, D., Aubry, L., Henry, L., Levieux, D., Hendil, K.B., Kuehn, L., Bureau, J.P., Ouali, A. (2002). "Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma." *J Immunol Methods*. 260(1-2): 183-193.

Fahy, B.N., Schlieman, M.G., Virudachalam, S., Bold, R.J. (2003). "Schedule-dependent molecular effects of the proteasome inhibitor bortezomib and gemcitabine in pancreatic cancer." *J Surg Res* 113(1): 88-95.

Fahy, B.N., Schlieman, M.G., Mortenson, M.M., Virudachalam, S., Bold, R.J. (2005). "Targeting BCL-2 overexpression in various human malignancies through NF-kappaB inhibition by the proteasome inhibitor bortezomib." *Cancer Chemother Pharmacol* 56(1): 46-54.

Fernandez, V., Hartmann, E., Ott, G., Campo, E., Rosenwald, A. (2005). "Pathogenesis of Mantle-Cell Lymphoma: All Oncogenic Roads Lead to Dysregulation of Cell Cycle and DNA Damage Response Pathways." *J Clin Oncol* 23: 6364-6369.

Ferrer, A., Marcé, S., Bellosillo, B., Villamor, N., Bosch, F., López-Guillermo, A., Espinet, B., Solé, F., Montserrat, E., Campo, E., Colomer, D. (2004). "Activation of mitochondrial apoptotic pathway in mantle cell lymphoma: high sensitivity to mitoxantrone in cases with functional DNA-damage response genes." *Oncogene* 23(55): 8941-8949.

Fisher, R.I., Bernstein, S.H., Kahl, B.S., Djulbegovic, B., Robertson, M.J., de Vos, S., Epner, E., Krishnan, A., Leonard, J.P., Lonial, S., Stadtmauer, E.A., O'Connor, O.A., Shi, H., Boral, A.L., Goy, A. (2006). "Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma." *J Clin Oncol* 24(30): 4867-4874.

Forstpointner, R., Dreyling, M., Repp, R., Hermann, S., Hanel, A., Metzner, B., Pott, C., Hartmann, F., Rothmann, F., Rohrberg, R., Bock, H.P., Wandt, H., Unterhalt, M., Hiddemann, W. (2004). "The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and

Literaturverzeichnis

prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group." *Blood* 104: 3064-3071.

Frankel, A., Man, S., Elliott, P., Adams, J., Kerbel, R.S. (2000). "Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341." *Clin Cancer Res* 6(9): 3719-3728.

Fribley, A., Zeng, Q., Wang, C.Y. (2004). "Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells." *Mol Cell Biol* 24(22): 9695-9704.

Fu, K., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Dave, S., Wright, G., Rosenwald, A., Chiorazzi, M., Iqbal, J., Gesk, S., Siebert, R., De Jong, D., Jaffe, E.S., Wilson, W.H., Delabie, J., Ott, G., Dave, B.J., Sanger, W.G., Smith, L.M., Rimsza, L., Braziel, R.M., Müller-Hermelink, H.K., Campo, E., Gascoyne, R.D., Staudt, L.M., Chan, W.C. (2005). "Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling." *Blood* 106: 4315-4321.

Fujita, T., Doihara, H., Washio, K., Kawasaki, K., Takabatake, D., Takahashi, H., Tsukuda, K., Ogasawara, Y., Shimizu, N. (2006). "Proteasome inhibitor bortezomib increases PTEN expression and enhances trastuzumab-induced growth inhibition in trastuzumab-resistant cells." *Anticancer Drugs* 17(4): 455-462.

Fukuchi, M., Fukai, Y., Masuda, N., Miyazaki, T., Nakajima, M., Sohda, M., Manda, R., Tsukada, K., Kato, H., Kuwano, H. (2002). "High-level expression of the Smad ubiquitin ligase Smurf2 correlates with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma." *Cancer Res.* 62(24): 7162-7165.

Gatto, S., Scappini, B., Pham, L., Onida, F., Milella, M., Ball, G., Ricci, C., Divoky, V., Verstovsek, S., Kantarjian, H.M., Keating, M.J., Cortes-Franco, J.E., Beran, M. (2003). "The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth and induces apoptosis in Bcr/Abl-positive cell lines sensitive and resistant to imatinib mesylate." *Haematologica/the hematology journal* 88(8): 853-863.

Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., Finley, D. (1998). "A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3." *Cell* 94(5): 615-623.

Glickman, M.H., Ciechanover, A. (2002). "The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction." *Physiol Rev* 82(2): 373-428.

Goel, A., Dispenzieri, A., Greipp, P.R., Witzig, T.E., Mesa, R.A., Russell, S.J. (2005). "PS-341-mediated selective targeting of multiple myeloma cells by synergistic increase in ionizing radiation-induced apoptosis." *Exp Hematol* 33(7): 784-795.

Gomez-Bougie, P., Wuillème-Toumi, S., Ménoret, E., Trichet, V., Robillard, N., Philippe, M., Bataille, R., Amiot, M. (2007). "Noxa Up-regulation and Mcl-1 Cleavage Are Associated to Apoptosis Induction by Bortezomib in Multiple Myeloma." *Cancer Res* 67(11): 5418-5424.

Literaturverzeichnis

- Gopal, A.K., Rajendran, J.G., Petersdorf, S.H., Maloney, D.G., Eary, J.F., Wood, B.L., Gooley, T.A., Bush, S.A., Durack, L.D., Martin, P.J., Matthews, D.C., Appelbaum, F.R., Bernstein, I.D., Press, O.W. (2002). "High-dose chemo-radioimmunotherapy with autologous stem cell support for relapsed mantle cell lymphoma." *Blood* 99: 3158-3162.
- Goy, A., Younes, A., McLaughlin, P., Pro, B., Romaguera, J.E., Hagemester, F., Fayad, L., Dang, N.H., Samaniego, F., Wang, M., Broglio, K., Samuels, B., Gilles, F., Sarris, A.H., Hart, S., Trehu, E., Schenkein, D., Cabanillas, F., Rodriguez, A.M. (2005). "Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma." *J Clin Oncol* 23(4): 667-675.
- Goy, A., Bernstein, S.H., Kahl, B.S., Djulbegovic, B., Robertson, M.J., de Vos, S., Epner, E., Krishnan, A., Leonard, J.P., Lonial, S., Nasta, S., O'Connor, O.A., Shi, H., Boral, A.L., Fisher, R.I. (2009). "Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study." *Ann Oncol* 20(3): 520-525.
- Guadagno, T.M., Newport, J.W. (1996). "Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of Cdc2-cyclin B kinase activity." *Cell* 84(1): 73-82.
- Guzman, M.L., Swiderski, C.F., Howard, D.S., Grimes, B.A., Rossi, R.M., Szilvassy, S.J., Jordan, C.T. (2002). "Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(25): 16220-16225.
- Hangaishi, A., Ogawa, S., Qiao, Y., Wang, L., Hosoya, N., Yuji, K., Imai, Y., Takeuchi, K., Miyawaki, S., Hirai, H. (2002). "Mutations of Chk2 in primary hematopoietic neoplasms." *Blood* 99: 3075-3077.
- Haritunians, T., Mori, A., O'Kelly, J., Luong, Q.T., Giles, F.J., Koeffler, H.P. (2007). "Antiproliferative activity of RAD001 (everolimus) as a single agent and combined with other agents in mantle cell lymphoma." *Leukemia* 21(2): 333-339.
- Harris, S.L., Levine, A.J. (2005). "The p53 pathway: positive and negative feedback loops." *Oncogene* 24: 2899-2908.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazanietz, A., Oren, M. (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." *Nature* 387(6630): 296-299.
- Heider, U., von Metzler, I., Kaiser, M., Rosche, M., Sterz, J., Rötzer, S., Rademacher, J., Jakob, C., Fleissner, C., Kuckelkorn, U., Kloetzel, P.M., Sezer, O. (2008). "Synergistic interaction of the histone deacetylase inhibitor SAHA with the proteasome inhibitor bortezomib in mantle cell lymphoma." *Eur J Haematol* 80(2): 133-42.
- Hernandez, L., Bea, S., Pinyol, M., Ott, G., Katzenberger, T., Rosenwald, A., Bosch, F., Lopez-Guillermo, A., Delabie, J., Colomer, D., Montserrat, E., Campo, E. (2005). "CDK4 and MDM2 Gene Alterations Mainly Occur in Highly Proliferative and Aggressive Mantle Cell Lymphomas with Wild-type INK4a/ARF Locus." *Cancer Res* 65: 2199-2206.

Literaturverzeichnis

Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V.J., Elliott, P.J., Adams, J., Anderson, K.C. (2001). "The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells." *Cancer Res* 61(7): 3071-3076.

Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J., Anderson, K.C. (2002). "NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma." *J Biol Chem* 277(19): 16639-16647.

Hideshima, T., Chauhan, D., Hayashi, T., Akiyama, M., Mitsiades, N., Mitsiades, C., Podar, K., Munshi, N.C., Richardson, P.G., Anderson, K.C. (2003). "Proteasome inhibitor PS-341 abrogates IL-6 triggered signaling cascades via caspase-dependent downregulation of gp130 in multiple myeloma." *Oncogene* 22(52): 8386-8393.

Hideshima, T., Podar, K., Chauhan, D., Ishitsuka, K., Mitsiades, C., Tai, Y.T., Hamasaki, M., Raje, N., Hideshima, H., Schreiner, G., Nguyen, A.N., Navas, T., Munshi, N.C., Richardson, P.G., Higgins, L.S., Anderson, K.C. (2004). "p38 MAPK inhibition enhances PS-341 (bortezomib)-induced cytotoxicity against multiple myeloma cells." *Oncogene* 23(54): 8766-8776.

Hideshima, T., Bradner, J.E., Wong, J., Chauhan, D., Richardson, P., Schreiber, S.L., Anderson, K.C. (2005). "Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(24): 8567-8572.

Hummel, M., Tamaru, J., Kalvelage, B. (1994). "Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle." *Blood* 84: 403-407.

Hunter, T., Pines, J. (1994). "Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age." *Cell* 79: 573-582.

Ikezoe, T., Yang, Y., Saito, T., Koeffler, H.P., Taguchi, H. (2004). "Proteasome inhibitor PS-341 down-regulates prostate-specific antigen (PSA) and induces growth arrest and apoptosis of androgen-dependent human prostate cancer LNCaP cells." *Cancer Sci* 95(3): 271-275.

Ishii, Y., Pirkmaier, A., Alvarez, J.V., Frank, D.A., Keselman, I., Logothetis, D., Mandeli, J., O'Connell, M.J., Waxman, S., Germain, D. (2006). "Cyclin D1 overexpression and response to bortezomib treatment in a breast cancer model." *J Natl Cancer Inst* 98(17): 1238-1247.

Jagannath, S., Durie, B.G., Wolf, J., Camacho, E., Irwin, D., Lutzky, J., McKinley, M., Gabayan, E., Mazumder, A., Schenkein, D., Crowley, J. (2005). "Bortezomib therapy alone and in combination with dexamethasone for previously untreated symptomatic multiple myeloma." *Br J Haematol* 129(6): 776-783.

Johnson, T.R., Stone, K., Nikrad, M., Yeh, T., Zong, W.X., Thompson, C.B., Nesterov, A., Kraft, A.S. (2003). "The proteasome inhibitor PS-341 overcomes TRAIL

Literaturverzeichnis

resistance in Bax and caspase 9-negative or Bcl-xL overexpressing cells." *Oncogene* 22(32): 4953-4963.

Jones, R.J., Chen, Q., Voorhees, P.M., Young, K.H., Bruey-Sedano, N., Yang, D., Orłowski, R.Z. (2008). "Inhibition of the p53 E3 ligase HDM-2 induces apoptosis and DNA damage--independent p53 phosphorylation in mantle cell lymphoma." *Clin Cancer Res* 14(17): 5416-25.

Jung, C.S., Zhou, Z., Khuri, F.R., Sun, S.Y. (2007). "Assessment of Apoptosis-Inducing Effects of Docetaxel Combined with the Proteasome Inhibitor PS-341 in Human Lung Cancer Cells." *Cancer Biol Ther* 6(5): [Epub ahead of print].

Kanayama, H., Tanaka, K., Aki, M., Kagawa, S., Miyaji, H., Satoh, M., Okada, F., Sato, S., Shimbara, N., Ichihara, A. (1991). "Changes in expressions of proteasome and ubiquitin genes in human renal cancer cells." *Cancer Res.* 51(24): 6677-6685.

Kane, R.C., Dagher, R., Farrell, A., Ko, C.W., Sridhara, R., Justice, R., Pazdur, R. (2007). "Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma." *Clin Cancer Res* 13(18 Pt 1): 5291-5294.

Kantarjian, H., Barlogie, B., Plunkett, W., Velasquez, W., McLaughlin, P., Riggs, S., Cabanillas, F. (1983). "High-dose cytosine arabinoside in non-Hodgkin's lymphoma." *J Clin Oncol* 1(11): 689-694.

Karin, M., Ben-Neriah, Y. (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity." *Annu Rev Immunol* 18: 621-663.

Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., Li, Z.W. (2002). "NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit." *Nat Rev Cancer* 2(4): 301-310.

Kaufmann, H., Raderer, M., Wohrer, S., Puspok, A., Bankier, A., Zielinski, C., Chott, A., Drach, J. (2004). "Antitumor activity of rituximab plus thalidomide in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma." *Blood* 104: 2269-2271.

Kettner, C.A., Shenvi, A.B. (1984). "Inhibition of the serine proteases leukocyte elastase, pancreatic elastase, cathepsin G, and chymotrypsin by peptide boronic acids." *J Biol Chem* 259(24): 15106-15114.

Khouri, I.F., Lee, M.S., Romaguera, J., Mirza, N., Kantarjian, H., Korbling, M., Albitar, M., Giralt, S., Samuels, B., Anderlini, P., Rodriguez, J., von Wolff, B., Gajewski, J., Cabanillas, F., Champlin, R. (1999). "Allogeneic hematopoietic transplantation for mantle-cell lymphoma: molecular remissions and evidence of graft-versus-malignancy." *Ann Oncol* 10: 1293-1299.

Khouri, I.F., Lee, M.S., Saliba, R.M., Jun, G., Fayad, L., Younes, A., Pro, B., Acholonu, S., McLaughlin, P., Katz, R.L., Champlin, R.E. (2003). "Nonablative allogeneic stem-cell transplantation for advanced/recurrent mantle-cell lymphoma." *J Clin Oncol* 21: 4407-4412.

King, R.W., Deshaies, R.J., Peters, J.M., Kirschner, M.W. (1996). "How proteolysis drives the cell cycle." *Science* 274(5293): 1652-1659.

Literaturverzeichnis

Kisselev, A.F., Goldberg, A.E. (2001). "Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates." *Chem Biol.* 8(8): 739-758.

Kröber, A., Seiler, T., Benner, A., Bullinger, L., Brückle, E., Lichter, P., Döhner, H., Stilgenbauer, S. (2002). "VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* 100: 1410-1416.

Kumatori, A., Tanaka, K., Inamura, N., Sone, S., Ogura, T., Matsumoto, T., Tachikawa, T., Shin, S., Ichihara, A. (1990). "Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(18): 7071-7075.

Landowski, T.H., Megli, C.J., Nullmeyer, K.D., Lynch, R.M., Dorr, R.T. (2005). "Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca²⁺ is a critical determinant of Velcade (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines." *Cancer Res* 65(9): 3828-3836.

Lashinger, L.M., Zhu, K., Williams, S.A., Shrader, M., Dinney, C.P., McConkey, D.J. (2005). "Bortezomib abolishes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance via a p21-dependent mechanism in human bladder and prostate cancer cells." *Cancer Res* 65(11): 4902-4908.

LeBlanc, R., Catley, L.P., Hideshima, T., Lentzsch, S., Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Neuberg, D., Goloubeva, O., Pien, C.S., Adams, J., Gupta, D., Richardson, P.G., Munshi, N.C., Anderson, K.C. (2002). "Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model." *Cancer Res* 62(17): 4996-5000.

Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Anderson, K.C., Glimcher, L.H. (2003). "Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(17): 9946-9951.

Lefrère, F., Delmer, A., Suzan, F., Levy, V., Belanger, C., Djabbari, M., Arnulf, B., Damaj, G., Maillard, N., Ribrag, V., Janvier, M., Sebban, C., Casasnovas, R.O., Bouabdallah, R., Dreyfus, F., Verkarre, V., Delabesse, E., Valensi, F., McIntyre, E., Brousse, N., Varet, B., Hermine, O. (2002). "Sequential chemotherapy by CHOP and DHAP regimens followed by high-dose therapy with stem cell transplantation induces a high rate of complete response and improves event-free survival in mantle cell lymphoma: a prospective study." *Leukemia* 16(4): 587-593.

Lenz, G., Dreyling, M., Hiddemann, W. (2004). "Mantle cell lymphoma: established therapeutic options and future directions." *Ann Hematol* 83(2): 71-77.

Lenz, G., Dreyling, M., Hoster, E., Wormann, B., Duhrsen, U., Metzner, B., Eimermacher, H., Neubauer, A., Wandt, H., Steinhauer, H., Martin, S., Heidemann, E., Aldaoud, A., Parwaresch, R., Hasford, J., Unterhalt, M., Hiddemann, W. (2005). "Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell

Literaturverzeichnis

lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG)." *J Clin Oncol* 23: 1984-92.

Lim, M.S., Adamson, A., Lin, Z., Perez-Ordenez, B., Jordan, R.C., Tripp, S., Perkins, S.L., Elenitoba-Johnson, K.S. (2002). "Expression of Skp2, a p27(Kip1) ubiquitin ligase, in malignant lymphoma: correlation with p27(Kip1) and proliferation index." *Blood* 100(8): 2950-2956.

Ling, Y.H., Liebes, L., Ng, B., Buckley, M., Elliott, P.J., Adams, J., Jiang, J.D., Muggia, F.M., Perez-Soler, R. (2002). "PS-341, a novel proteasome inhibitor, induces Bcl-2 phosphorylation and cleavage in association with G2-M phase arrest and apoptosis." *Mol Cancer Ther* 1(10): 841-849.

Ling, Y.H., Liebes, L., Jiang, J.D., Holland, J.F., Elliott, P.J., Adams, J., Muggia, F.M., Perez-Soler, R. (2003). "Mechanisms of proteasome inhibitor PS-341-induced G(2)-M-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines." *Clin Cancer Res* 9(3): 1145-1154.

Liu, X., Yue, P., Chen, S., Hu, L., Lonial, S., Khuri, F.R., Sun, S.Y. (2007). "The proteasome inhibitor PS-341 (bortezomib) up-regulates DR5 expression leading to induction of apoptosis and enhancement of TRAIL-induced apoptosis despite up-regulation of c-FLIP and survivin expression in human NSCLC cells." *Cancer Res* 67(10): 4981-4988.

Lopes, U.G., Erhardt, P., Yao, R., Cooper, G.M. (1997). "p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors." *J Biol Chem* 272(20): 12893-12896.

Lun, M., Zhang, P.L., Siegelmann-Danieli, N., Blasick, T.M., Brown, R.E. (2005). "Intracellular inhibitory effects of Velcade correlate with morphoproteomic expression of phosphorylated-nuclear factor-kappaB and p53 in breast cancer cell lines." *Ann Clin Lab Sci* 35(1): 15-24.

Lun, M., Zhang, P.L., Pellitteri, P.K., Law, A., Kennedy, T.L., Brown, R.E. (2005). "Nuclear factor-kappaB pathway as a therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma: pharmaceutical and molecular validation in human cell lines using Velcade and siRNA/NF-kappaB." *Ann Clin Lab Sci* 35(3): 251-258.

Ma, M.H., Yang, H.H., Parker, K., Manyak, S., Friedman, J.M., Altamirano, C., Wu, Z.Q., Borad, M.J., Frantzen, M., Roussos, E., Neeser, J., Mikail, A., Adams, J., Sjak-Shie, N., Vescio, R.A., Berenson, J.R. (2003). "The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents." *Clin Cancer Res* 9(3): 1136-1144.

Mabuchi, S., Ohmichi, M., Nishio, Y., Hayasaka, T., Kimura, A., Ohta, T., Saito, M., Kawagoe, J., Takahashi, K., Yada-Hashimoto, N., Sakata, M., Motoyama, T., Kurachi, H., Tasaka, K., Murata, Y. (2004). "Inhibition of NFkappaB increases the efficacy of cisplatin in in vitro and in vivo ovarian cancer models." *J Biol Chem* 279(22): 23477-23485.

Mantel, C., Braun, S.E., Reid, S., Henegariu, O., Liu, L., Hangoc, G., Broxmeyer, H.E. (1999). "p21(cip-1/waf-1) deficiency causes deformed nuclear architecture,

Literaturverzeichnis

centriole overduplication, polyploidy, and relaxed microtubule damage checkpoints in human hematopoietic cells." *Blood* 93(4): 1390-1398.

Marx, C., Yau, C., Banwait, S., Zhou, Y., Scott, G.K., Hann, B., Park, J.W., Benz, C.C. (2007). "Proteasome-Regulated ERBB2 and Estrogen Receptor Pathways in Breast Cancer." *Mol Pharmacol* 71(6): 1525-1534.

Masdehors, P., Omura, S., Merle-Béral, H., Mentz, F., Cosset, J.M., Dumont, J., Magdelénat, H., Delic, J. (1999). "Increased sensitivity of CLL-derived lymphocytes to apoptotic death activation by the proteasome-specific inhibitor lactacystin." *Br J Haematol* 105(3): 752-757.

Masdehors, P., Merle-Béral, H., Maloum, K., Omura, S., Magdelénat, H., Delic, J. (2000). "Deregulation of the ubiquitin system and p53 proteolysis modify the apoptotic response in B-CLL lymphocytes." *Blood* 96(1): 269-274.

Mateos, M.V., Hernández, J.M., Hernández, M.T., Gutiérrez, N.C., Palomera, L., Fuertes, M., Díaz-Mediavilla, J., Lahuerta, J.J., de la Rubia, J., Terol, M.J., Sureda, A., Bargay, J., Ribas, P., de Arriba, F., Alegre, A., Oriol, A., Carrera, D., García-Laraña, J., García-Sanz, R., Bladé, J., Prósper, F., Mateo, G., Esseltine, D.L., van de Velde, H., San Miguel, J.F. (2006). "Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of a multicenter phase 1/2 study." *Blood* 108(7): 2165-2172.

Mimnaugh, E.G., Yunmbam, M.K., Li, Q., Bonvini, P., Hwang, S.G., Trepel, J., Reed, E., Neckers, L. (2000). "Prevention of cisplatin-DNA adduct repair and potentiation of cisplatin-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells by proteasome inhibitors." *Biochem Pharmacol* 60(9): 1343-1354.

Minami, T., Adachi, M., Kawamura, R., Zhang, Y., Shinomura, Y., Imai, K. (2005). "Sulindac enhances the proteasome inhibitor bortezomib-mediated oxidative stress and anticancer activity." *Clin Cancer Res* 11(14): 5248-5256.

Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Richardson, P.G., Poulaki, V., Tai, Y.T., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Bailey, C., Joseph, M., Libermann, T.A., Schlossman, R., Munshi, N.C., Hideshima, T., Anderson, K.C. (2003). "The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications." *Blood* 101(6): 2377-80.

Mortenson, M.M., Schlieman, M.G., Virudachalam, S., Bold, R.J. (2004). "Effects of the proteasome inhibitor bortezomib alone and in combination with chemotherapy in the A549 non-small-cell lung cancer cell line." *Cancer Chemother Pharmacol* 54(4): 343-353.

Nademanee, A., Forman, S., Molina, A., Fung, H., Smith, D., Dagens, A., Kwok, C., Yamauchi, D., Anderson, A.L., Falk, P., Krishnan, A., Kirschbaum, M., Kogut, N., Nakamura, R., O'Donnell, M., Parker, P., Popplewell, L., Pullarkat, V., Rodriguez, R., Sahebi, F., Smith, E., Snyder, D., Stein, A., Spielberger, R., Zain, J., White, C., Raubitschek, A. (2005). "A phase 1/2 trial of high-dose yttrium-90-ibritumomab tiuxetan in combination with high-dose etoposide and cyclophosphamide followed by

Literaturverzeichnis

autologous stem cell transplantation in patients with poor-risk or relapsed non-Hodgkin lymphoma." *Blood* 106: 2896-2902.

Nagy, K., Székely-Szüts, K., Izeradjene, K., Douglas, L., Tillman, M., Barti-Juhász, H., Dominici, M., Spano, C., Luca Cervo, G., Conte, P., Houghton, J.A., Mihalik, R., Kopper, L., Peták, I. (2006). "Proteasome inhibitors sensitize colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via enhanced release of Smac/DIABLO from the mitochondria." *Pathol Oncol Res* 12(3): 133-142.

Nakanishi, C., Masakazu, T. (2005). "NUCLEAR FACTOR- κ B INHIBITORS AS SENSITIZERS TO ANTICANCER DRUGS." *Nat Rev Cancer* 5: 297-309.

Nalepa, G., Wade Harper, J. (2003). "Therapeutic anti-cancer targets upstream of the proteasome." *Cancer Treat Rev* 29(Suppl 1): 49-57.

Nasr, R., El-Sabban, M.E., Karam, J.A., Dbaibo, G., Kfoury, Y., Arnulf, B., Lepelletier, Y., Bex, F., de Thé, H., Hermine, O., Bazarbachi, A. (2005). "Efficacy and mechanism of action of the proteasome inhibitor PS-341 in T-cell lymphomas and HTLV-I associated adult T-cell leukemia/lymphoma." *Oncogene* 24(3): 419-430.

Navas, T.A., Nguyen, A.N., Hideshima, T., Reddy, M., Ma, J.Y., Haghazari, E., Henson, M., Stebbins, E.G., Kerr, I., O'Young, G., Kapoun, A.M., Chakravarty, S., Mavunkel, B., Perumattam, J., Luedtke, G., Dugar, S., Medicherla, S., Protter, A.A., Schreiner, G.F., Anderson, K.C., Higgins, L.S. (2006). "Inhibition of p38alpha MAPK enhances proteasome inhibitor-induced apoptosis of myeloma cells by modulating Hsp27, Bcl-X(L), Mcl-1 and p53 levels in vitro and inhibits tumor growth in vivo." *Leukemia* 20(6): 1017-1027.

Nawrocki, S.T., Sweeney-Gotsch, B., Takamori, R., McConkey, D.J. (2004). "The proteasome inhibitor bortezomib enhances the activity of docetaxel in orthotopic human pancreatic tumor xenografts." *Mol Cancer Ther* 3(1): 59-70.

Nawrocki, S.T., Carew, J.S., Dunner, K., Boise, L.H., Chiao, P.J., Huang, P., Abbruzzese, J.L., McConkey, D.J. (2005). "Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells." *Cancer Res* 65(24): 11510-11519.

Nawrocki, S.T., Carew, J.S., Pino, M.S., Highshaw, R.A., Dunner, K., Huang, P., Abbruzzese, J.L., McConkey, D.J. (2005). "Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis." *Cancer Res* 65(24): 11658-11666.

Nawrocki, S.T., Carew, J.S., Pino, M.S., Highshaw, R.A., Andtbacka, R.H., Dunner, K., Pal, A., Bornmann, W.G., Chiao, P.J., Huang, P., Xiong, H., Abbruzzese, J.L., McConkey, D.J. (2006). "Aggresome disruption: a novel strategy to enhance bortezomib-induced apoptosis in pancreatic cancer cells." *Cancer Res* 66(7): 3773-3781.

Neukirchen, J., Meier, A., Rohrbeck, A., Garcia-Pardillos, G., Steidl, U., Fenk, R., Haas, R., Kronenwett, R., Rohr, U.P. (2007). "The proteasome inhibitor bortezomib

Literaturverzeichnis

acts differently in combination with p53 gene transfer or cytotoxic chemotherapy on NSCLC cells." *Cancer Gene Ther* 14(4): 431-439.

Nikrad, M., Johnson, T., Puthalalath, H., Coultas, L., Adams, J., Kraft, A.S. (2005). "The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim." *Mol Cancer Ther* 4(3): 443-9.

O'Connor, O.A., Wright, J., Moskowitz, C., Muzzy, J., MacGregor-Cortelli, B., Stubblefield, M., Straus, D., Portlock, C., Hamlin, P., Choi, E., Dumetrescu, O., Esseltine, D., Trehu, E., Adams, J., Schenkein, D., Zelenetz, A.D. (2005). "Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma." *J Clin Oncol* 23(4): 676-684.

O'Connor, O.A. (2005). "Targeting histones and proteasomes: new strategies for the treatment of lymphoma." *J Clin Oncol* 23(26): 6429-6436.

O'Connor, O.A., Moskowitz, C., Portlock, C., Hamlin, P., Straus, D., Dumitrescu, O., Sarasohn, D., Gonen, M., Butos, J., Neylon, E., Hamelers, R., Mac-Gregor Cortelli, B., Blumel, S., Zelenetz, A.D., Gordon, L., Wright, J.J., Vose, J., Cooper, B., Winter, J. (2009). "Patients with chemotherapy-refractory mantle cell lymphoma experience high response rates and identical progression-free survivals compared with patients with relapsed disease following treatment with single agent bortezomib: results of a multicentre Phase 2 clinical trial." *Br J Haematol* 145(1): 34-39.

Ogiso, Y., Tomida, A., Lei, S., Omura, S., Tsuruo, T. (2000). "Proteasome inhibition circumvents solid tumor resistance to topoisomerase II-directed drugs." *Cancer Res* 60(9): 2429-34.

Okamoto, Y., Ozaki, T., Miyazaki, K., Aoyama, M., Miyazaki, M., Nakagawara, A. (2003). "UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme." *Cancer Res* 63(14): 4167-4173.

Orlowski, M., Wilks, S. (2000). "Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex." *Arch Biochem Biophys* 383: 1-16.

Orlowski, R.Z., Eswara, J.R., Lafond-Walker, A., Grever, M.R., Orlowski, M., Dang, C.V. (1998). "Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor." *Cancer Res* 58(19): 4342-4348.

Orlowski, R.Z., Stinchcombe, T.E., Mitchell, B.S., Shea, T.C., Baldwin, A.S., Stahl, S., Adams, J., Esseltine, D.L., Elliott, P.J., Pien, C.S., Guerciolini, R., Anderson, J.K., Depcik-Smith, N.D., Bhagat, R., Lehman, M.J., Novick, S.C., O'Connor, O.A., Soignet, S.L. (2002). "Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies." *J Clin Oncol* 20(22): 4420-4427.

Osaki, M., Oshimura, M., Ito, H. (2004). "PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer." *Apoptosis* 9: 667-676.

Pacifico, F., Leonardi, A. (2006). "NF-kappaB in solid tumors." *Biochem Pharmacol* 72(9): 1142-1152.

Literaturverzeichnis

- Pajonk, F., Pajonk, K., McBride, W.H. (2000). "Apoptosis and radiosensitization of hodgkin cells by proteasome inhibition." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47(4): 1025-1032.
- Paoluzzi, L., Gonen, M., Bhagat, G., Furman, R.R., Gardner, J.R., Scotto, L., Gueorguiev, V.D., Heaney, M.L., Manova, K., O'Connor, O.A. (2008). "The BH3-only mimetic ABT-737 synergizes the antineoplastic activity of proteasome inhibitors in lymphoid malignancies." *Blood* 112(7): 2906-16.
- Peggs, K.S., Mackinnon, S., Linch, D.C. (2005). "The role of allogeneic transplantation in non-Hodgkin's lymphoma." *Br J Haematol* 128: 153-68.
- Pei, X.Y., Dai, Y., Grant, S. (2003). "The proteasome inhibitor bortezomib promotes mitochondrial injury and apoptosis induced by the small molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1 in multiple myeloma cells." *Leukemia* 17(10): 2036-2045.
- Pei, X.Y., Dai, Y., Grant, S. (2004). "Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors." *Clin Cancer Res* 10(11): 3839-3852.
- Pérez-Galán, P., Roué, G., Villamor, N., Montserrat, E., Campo, E., Colomer, D. (2006). "The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status." *Blood* 107(1): 257-264.
- Pérez-Galán, P., Roué, G., Villamor, N., Campo, E., Colomer, D. (2007). "The BH3-mimetic GX15-070 synergizes with bortezomib in mantle cell lymphoma by enhancing Noxa-mediated activation of Bak." *Blood* 109(10): 4441-4449.
- Pérez-Galán, P., Roué, G., Villamor, N., Campo, E., Colomer, D. (2007). "The BH3-mimetic GX15-070 synergizes with bortezomib in mantle cell lymphoma by enhancing Noxa-mediated activation of Bak." *Blood* 109(10): 4441-4449.
- Pham, L.V., Tamayo, A.T., Yoshimura, L.C., Lo, P., Ford, R.J. (2003). "Inhibition of Constitutive NF- κ B Activation in Mantle Cell Lymphoma B Cells Leads to Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptosis." *The Journal of Immunology* 171: 88-95.
- Pinyol, M., Hernandez, L., Cazorla, M., Balbin, M., Jares, P., Fernandez, P.L., Montserrat, E., Cardesa, A., Lopez-Otin, C., Campo, E. (1997). "Deletions and Loss of Expression of P16INK4a and P21Waf1 Genes Are Associated With Aggressive Variants of Mantle Cell Lymphomas." *Blood* 89: 272-280.
- Rayet, B., Gélinas, C. (1999). "Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer." *Oncogene* 18(49): 6938-6947.
- Richardson, P.G., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., Rajkumar, S.V., Srkalovic, G., Alsina, M., Alexanian, R., Siegel, D., Orlowski, R.Z., Kuter, D., Limentani, S.A., Lee, S., Hideshima, T., Esseltine, D.L., Kauffman, M., Adams, J., Schenkein, D.P., Anderson, K.C. (2003). "A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma." *N Engl J Med* 348(26): 2609-2617.

Literaturverzeichnis

Richardson, P.G., Sonneveld, P., Schuster, M.W., Irwin, D., Stadtmauer, E.A., Facon, T., Harousseau, J.L., Ben-Yehuda, D., Lonial, S., Goldschmidt, H., Reece, D., San-Miguel, J.F., Bladé, J., Boccadoro, M., Cavenagh, J., Dalton, W.S., Boral, A.L., Esseltine, D.L., Porter, J.B., Schenkein, D., Anderson, K.C. (2005). "Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma." *N Engl J Med* 352(24): 2487-2498.

Richardson, P.G., Mitsiades, C., Hideshima, T., Anderson, K.C. (2005). "Proteasome Inhibition in the Treatment of Cancer." *Cell Cycle* 4(2): 290-296.

Rizzatti, E.G., Mora-Jensen, H., Weniger, M.A., Gibellini, F., Lee, E., Daibata, M., Lai, R., Wiestner, A. (2008). "Noxa mediates bortezomib induced apoptosis in both sensitive and intrinsically resistant mantle cell lymphoma cells and this effect is independent of constitutive activity of the AKT and NF-kappaB pathways." *Leuk Lymphoma*. 49(4): 798-808.

Robinson, S.P., Goldstone, A.H., Mackinnon, S., Carella, A., Russell, N., de Elvira, C.R., Taghipour, G., Schmitz, N. (2002). "Chemoresistant or aggressive lymphoma predicts for a poor outcome following reduced-intensity allogeneic progenitor cell transplantation: an analysis from the Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation." *Blood* 100: 4310-4316.

Rolland, D., Camara-Clayette, V., Barbarat, A., Salles, G., Coiffier, B., Ribrag, V., Thieblemont, C. (2008). "Farnesyltransferase inhibitor R115777 inhibits cell growth and induces apoptosis in mantle cell lymphoma." *Cancer Chemother Pharmacol* 61(5): 855-863.

Rosenwald, A., Wright, G., Wiestner, A., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Gascoyne, R.D., Grogan, T.M., Müller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Chiorazzi, M., Giltzane, J.M., Hurt, E.M., Zhao, H., Averett, L., Henrickson, S., Yang, L., Powell, J., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Klausner, R.D., Montserrat, E., Bosch, F., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Dave, B.J., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Fisher, R.I., Miller, T.P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J., Staudt, L.M. (2003). "The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma." *Cancer Cell* 3: 185-197.

Rudelius, M., Pittaluga, S., Nishizuka, S., Pham, T.H.T., Fend, F., Jaffe, E.S., Quintanilla-Martinez, L., Raffeld, M. (2006). "Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma." *Blood*:108(5): 1668-76

Russo, S.M., Tepper, J.E., Baldwin, A.S., Liu, R., Adams, J., Elliott, P., Cusack, J.C. (2001). "Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kappaB." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50(1): 183-193.

Rutkowski, D.T., Kaufman, R.J. (2004). "A trip to the ER: coping with stress." *Trends Cell Biol* 14(1): 20-28.

Literaturverzeichnis

Salaverria, I., Perez-Galan, P., Colomer, D., Campo, E. (2006). "Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives." *haematologica/the hematology journal* 90: 11-16.

Sampath, D., Rao, V.A., Plunkett, W. (2003). "Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs." *Oncogene* 22(56): 9063-9074.

Satou, Y., Nosaka, K., Koya, Y., Yasunaga, J.I., Toyokuni, S., Matsuoka, M. (2004). "Proteasome inhibitor, bortezomib, potently inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells both in vivo and in vitro." *Leukemia* 18(8): 1357-1363.

Schaffner, C., Idler, I., Stilgenbauer, S., Döhner, H., Lichter, P. (2000). "Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2773-2778.

Shah, S. A., Potter, M.W., McDade, T.P., Ricciardi, R., Perugini, R.A., Elliott, P.J., Adams, J., Callery, M.P. (2001). "26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer." *J Cell Biochem* 82(1): 110-122.

Sherr, C. J. (1996). "Cancer Cell Cycles." *Science* 274: 1672-1677.

Shirane, M., Harumiya, Y., Ishida, N., Hirai, A., Miyamoto, C., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kitagawa, M. (1999). "Down-regulation of p27(Kip1) by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing." *J Biol Chem* 274(20): 13886-13893.

Small, G.W., Shi, Y.Y., Edmund, N.A., Somasundaram, S., Moore, D.T., Orlowski, R.Z. (2004). "Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role." *Mol Pharmacol* 66(6): 1478-1490.

Soligo, D., Servida, F., Delia, D., Fontanella, E., Lamorte, G., Caneva, L., Fumiatti, R., Lambertenghi Delilieri, G. (2001). "The apoptogenic response of human myeloid leukaemia cell lines and of normal and malignant haematopoietic progenitor cells to the proteasome inhibitor PSI." *Br J Haematol* 113(1): 126-135.

Stilgenbauer, S., Winkler, D., Ott, G., Schaffner, C., Leupolt, E., Bentz, M., Möller, P., Müller-Hermelink, H.K., James, M.R., Lichter, P., Döhner, H. (1999). "Molecular Characterization of 11q Deletions Points to a Pathogenic Role of the ATM Gene in Mantle Cell Lymphoma." *Blood* 94: 3262-3264.

Sun, X.M., Butterworth, M., MacFarlane, M., Dubiel, W., Ciechanover, A., Cohen, G.M. (2004). "Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis." *Mol Cell* 14(1): 81-93.

Sunwoo, J.B., Chen, Z., Dong, G., Yeh, N., Crowl Bancroft, C., Sausville, E., Adams, J., Elliott, P., Van Waes, C. (2001). "Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma." *Clin Cancer Res* 7(5): 1419-1428.

Literaturverzeichnis

- Swerdlow, S.H., Williams, M.E. (2002). "From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades." *Hum Pathol* 33: 7-20.
- Tabe, Y., Sebasigari, D., Jin, L., Rudelius, M., Davies-Hill, T., Miyake, K., Miida, T., Pittaluga, S., Raffeld, M. (2009). "MDM2 antagonist nutlin-3 displays antiproliferative and proapoptotic activity in mantle cell lymphoma." *Clin Cancer Res* 15(3): 933-42.
- Takigawa, N., Vaziri, S.A., Grabowski, D.R., Chikamori, K., Rybicki, L.R., Bukowski, R.M., Ganapathi, M.K., Ganapathi, R., Mekhail, T. (2006). "Proteasome inhibition with bortezomib enhances activity of topoisomerase I-targeting drugs by NF-kappaB-independent mechanisms." *Anticancer Res* 26(3A): 1869-1876.
- Tan, C., Waldmann, T.A. (2002). "Proteasome inhibitor PS-341, a potential therapeutic agent for adult T-cell leukemia." *Cancer Res* 62(4): 1083-1086.
- Teicher, B.A., Ara, G., Herbst, R., Palombella, V.J., Adams, J. (1999). "The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy." *Clin Cancer Res* 5(9): 2638-2645.
- Tiemann, M., Schrader, C., Klapper, W., Dreyling, M., Campo, E., Norton, A., Berger, F., Kluin, P., Ott, G., Pileri, S., Pedrinis, E., Feller, A.C., Merz, H., Janssen, D., Hansmann, M.L., Krieken, H., Möller, P., Stein, H., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Parwaresch, R., (2005). "Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network." *Br J Haematol* 131: 29-38.
- Tort, F., Hernandez, S., Bea, S., Camacho, E., Fernandez, V., Esteller, M., Fraga, M.F., Burek, C., Rosenwald, A., Hernandez, L., Campo, E. (2005). "Checkpoint kinase 1 (CHK1) protein and mRNA expression is downregulated in aggressive variants of human lymphoid neoplasms." *Leukemia* 19: 112-117.
- Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P.C., Croce, C.M. (1984). "Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation." *Science* 224: 1403-1406.
- Vandenberghe, E., Ruiz de Elvira, C., Loberiza, F.R., Conde, E., Lopez-Guillermo, A., Gisselbrecht, C., Guilhot, F., Vose, J.M., van Biesen, K., Rizzo, J.D., Weisenburger, D.D., Isaacson, P., Horowitz, M.M., Goldstone, A.H., Lazarus, H.M., Schmitz, N. (2003). "Outcome of autologous transplantation for mantle cell lymphoma: a study by the European Blood and Bone Marrow Transplant and Autologous Blood and Marrow Transplant Registries." *Br J Haematol* 120: 793-800.
- Voorhees, P.M., Orlowski, R.Z. (2006). "The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 189-213.
- Voortman, J., Checinska, A., Giaccone, G., Rodriguez, J.A., Kruyt, F.A. (2007). "Bortezomib, but not cisplatin, induces mitochondria-dependent apoptosis accompanied by up-regulation of noxa in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460." *Mol Cancer Ther* 6(3): 1046-1053.

Literaturverzeichnis

- Walsh, S.H., Rosenquist, R. (2005). "Immunoglobulin Gene Analysis of Mature B-Cell Malignancies: Reconsideration of Cellular Origin and Potential Antigen Involvement in Pathogenesis." *Med Oncol* 22: 327-342.
- Wang, M., Han, X.H., Zhang, L., Yang, J., Qian, J.F., Shi, Y.K., Kwak, L.W., Romaguera, J., Yi, Q. (2008). "Bortezomib is synergistic with rituximab and cyclophosphamide in inducing apoptosis of mantle cell lymphoma cells in vitro and in vivo." *Leukemia* 22(1): 179-85.
- Wang, Q., Mora-Jensen, H., Weniger, M.A., Perez-Galan, P., Wolford, C., Hai, T., Ron, D., Chen, W., Trenkle, W., Wiestner, A., Ye, Y. (2009). "ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(7): 2200-5.
- Webster, G.A., Perkins, N.D. (1999). "Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53." *Mol Cell Biol* 19(5): 3485-3495.
- Weigert, O., Pastore, A., Rieken, M., Lang, N., Hiddemann, W., Dreyling, M. (2007). "Sequence-dependent synergy of the proteasome inhibitor bortezomib and cytarabine in mantle cell lymphoma." *Leukemia* 21(3): 524-528.
- Weigert, O., Weidmann, E., Mueck, R., Bentz, M., von Schilling, C., Rohrberg, R., Jentsch-Ullrich, K., Hiddemann, W., Dreyling, M. (2009). "A novel regimen combining high dose cytarabine and bortezomib has activity in multiply relapsed and refractory mantle cell lymphoma - long-term results of a multicenter observation study." *Leuk Lymphoma* 50(5): 716-22.
- Williams, S., Pettaway, C., Song, R., Papandreou, C., Logothetis, C., McConkey, D.J. (2003). "Differential effects of the proteasome inhibitor bortezomib on apoptosis and angiogenesis in human prostate tumor xenografts." *Mol Cancer Ther* 2(9): 835-843.
- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., Huang, D.C. (2005). "Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins." *Genes Dev* 19(11): 1294-1305.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., Strasser, A., Kluck, R.M., Adams, J.M., Huang, D.C. (2007). "Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak." *Science* 315(5813): 856-859.
- Witzig, T.E. (2005). "Current Treatment Approaches for Mantle-Cell Lymphoma." *J Clin Oncol* 23: 6409-6414.
- Witzig, T.E., Geyer, S.M., Ghobrial, I., Inwards, D.J., Fonseca, R., Kurtin, P., Ansell, S.M., Luyun, R., Flynn, P.J., Morton, R.F., Dakhil, S.R., Gross, H., Kaufmann, S.H. (2005). "Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma." *J Clin Oncol* 23: 5347-5356.

Literaturverzeichnis

- Xu, H., Ju, D., Jarois, T., Xie, Y. (2007). "Diminished feedback regulation of proteasome expression and resistance to proteasome inhibitors in breast cancer cells." *Breast Cancer Res Treat*: 2007 Mar 13; [Epub ahead of print]
- Yanamandra, N., Colaco, N.M., Parquet, N.A., Buzzeo, R.W., Boulware, D., Wright, G., Perez, L.E., Dalton, W.S., Beaupre, D.M. (2006). "Tipifarnib and bortezomib are synergistic and overcome cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma and acute myeloid leukemia." *Clin Cancer Res* 12(2): 591-599.
- Yang, Y., Ikezoe, T., Saito, T., Kobayashi, M., Koeffler, H.P., Taguchi, H. (2004). "Proteasome inhibitor PS-341 induces growth arrest and apoptosis of non-small cell lung cancer cells via the JNK/c-Jun/AP-1 signaling." *Cancer Sci* 95(2): 176-180.
- Yang, Y., Li, C.C., Weissman, A.M. (2004). "Regulating the p53 system through ubiquitination." *Oncogene*. 23(11): 2096-2106.
- Yeung, B. H., Huang, D.C., Sinicrope, F.A. (2006). "PS-341 (bortezomib) induces lysosomal cathepsin B release and a caspase-2-dependent mitochondrial permeabilization and apoptosis in human pancreatic cancer cells." *J Biol Chem* 281(17): 11923-11932.
- Yu, C., Rahmani, M., Conrad, D., Subler, M., Dent, P., Grant, S. (2003). "The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to STI571." *Blood* 102(10): 3765-3774.
- Yu, C., Friday, B.B., Lai, J.P., Yang, L., Sarkaria, J., Kay, N.E., Carter, C.A., Roberts, L.R., Kaufmann, S.H., Adjei, A.A. (2006). "Cytotoxic synergy between the multikinase inhibitor sorafenib and the proteasome inhibitor bortezomib in vitro: induction of apoptosis through Akt and c-Jun NH2-terminal kinase pathways." *Mol Cancer Ther* 5(9): 2378-2387.
- Zhang, H.G., Wang, J., Yang, X., Hsu, H.C., Mountz, J.D. (2004). "Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin." *Oncogene* 23(11): 2009-2015.
- Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D.J., Hemmati-Brivanlou, A., Derynck, R. (2001). "Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(3): 974-979.
- Zhou, B. B. S., Elledge, S.J. (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." *Nature* 408: 433-439.
- Zhu, H., Zhang, L., Dong, F., Guo, W., Wu, S., Teraishi, F., Davis, J.J., Chiao, P.J., Fang, B. (2005). "Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors." *Oncogene* 24(31): 4993-4999.
- Zhu, H., Guo, W., Zhang, L., Wu, S., Teraishi, F., Davis, J.J., Dong, F., Fang, B. (2005). "Proteasome inhibitors-mediated TRAIL resensitization and Bik accumulation." *Cancer Biol Ther* 4(7): 781-786.

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Malte Rieken
Lothringerstrasse 94
CH-4056 Basel
Geburtsdatum: 07.02.1980
Geburtsort: Eggenfelden

Schul Ausbildung, Zivildienst

Juni 1999	Allgemeine Hochschulreife am Karl-von-Closen Gymnasium Eggenfelden
Juli 1999 – Juni 2000	Zivildienst im allgemeinen Pflegedienst der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Eggenfelden

Hochschulstudium

September 2000	Studienbeginn Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
August 2002	Ärztliche Vorprüfung
August 2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2006	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2006 – März 2007	Praktisches Jahr
April 2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen, Austauschprogramme

Februar/ März 2003	Innere Medizin, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, München
September/ Oktober 2003	Hämatologie und Onkologie, III. medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
September/ Oktober 2004	Allgemeine Chirurgie, Royal Hospital, Muscat, Sultanat Oman
März/ April 2005	Teilnahme am United States Europe Medical Educational Exchange (US-EU-MEE) mit der Harvard Medical School, Boston, MA, USA
August/ September 2005	Urologie, Urologische Klinik Planegg, München

Lebenslauf

Praktisches Jahr

Urologie	April 2006 – August 2006 Urologische Klinik und Poliklinik, Klinikum der Universität München – Großhadern
Chirurgie	August 2006 – Oktober 2006 All India Institute of Medical Sciences Hospital All India Institute of Medical Sciences, Neu Delhi, Indien Oktober 2006 – November 2006 Singapore General Hospital National University of Singapore, Singapur
Innere Medizin	November 2006 – Januar 2007 Prince of Wales Hospital The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR Januar 2007 – März 2007 Medizinische Klinik und Poliklinik III, Klinikum der Universität München – Großhadern

Ärztliche Tätigkeit

Seit August 2007 Assistenzarzt an der Urologischen Universitätsklinik Basel – Liestal, Universitätsspital Basel, Schweiz

Stipendien - Preise

Poster des Tages – 62. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Düsseldorf 2010
EAU Best Poster – European Association of Urology Annual Meeting, Barcelona 2010
EAU Best Poster – European Association of Urology Annual Meeting, Stockholm 2009
Privat-Fond Nachlass John Loesch der Ludwig-Maximilians-Universität München
American Society of Hematology, ASH Travel Award 2005

Veröffentlichungen:

Rieken, M., Kang, HW., Koullick, E., Ruth, GR., Bachmann, A. (2010). "Laser vaporization of the prostate in vivo: Experience with the 150-W 980-nm diode laser in living canines." *Lasers Surg Med.* 42(8):736-42

Bonkat, G., Rieken, M., Rentsch, CA., Wyler, S., Feicke, A., Schäfer, J., Gasser, T., Trampuz, A., Bachmann, A., Widmer, AF. (2010). "Improved detection of microbial ureteral stent colonisation by sonication." *World J Urol.* 2010 Mar 21 [Epub ahead of print].

Rieken, M., Ebinger Mundorff, N., Bonkat, G., Wyler, S., Bachmann, A. (2010). "Complications of laser prostatectomy: a review of recent data." *World J Urol.* 28(1):53-62

Rieken, M., Bachmann, A., Reich, O. (2010). "Re: High power diode laser vaporization of the prostate: preliminary results for benign prostatic hyperplasia A. Erol, K. Cam, A. Tekin, O. Memik, S. Coban And Y. Ozer *J Urol* 2009; 182: 1078-1082." *J Urol* 183(2):828-9; author reply 829-30

Lebenslauf

Rieken, M., Bachmann, A. (2009). "Thermal lasers in urology." *Medical Laser Applications* 2009 December 22, in press, corrected proof

Reich, O., Schlenker, B., Gratzke, C., Tilki, D., Rieken, M., Stief, C., Seitz, M., Bachmann, A. (2009). "Plasma Vaporisation of the Prostate: Initial Clinical Results." *Eur Urol* 2009 May 26. [Epub ahead of print].

Milani, V., Lorenz, M., Weinkauff, M., Rieken, M., Pastore, A., Dreyling, M., Issels, R. (2009). "Combination of hyperthermia and bortezomib results in additive killing in mantle cell lymphoma cells." *Int J Hyperthermia* 25(4): 262-72

Weinkauff, M., Zimmermann, Y., Hartmann, E., Rosenwald, A., Rieken, M., Pastore, A., Hutter, G., Hiddemann, W., Dreyling, M. (2009). "2-D PAGE-based comparison of proteasome inhibitor bortezomib in sensitive and resistant mantle cell lymphoma." *Electrophoresis* 30(6): 974-86.

Ruszat, R., Seitz, M., Wyler, S.F., Müller, G., Rieken, M., Bonkat, G., Gasser, T.C., Reich, O., Bachmann, A. (2009). "Prospective single-centre comparison of 120-W diode-pumped solid-state high-intensity system laser vaporization of the prostate and 200-W high-intensive diode-laser ablation of the prostate for treating benign prostatic hyperplasia." *BJU Int.* 104(6): 820-5

Ruszat, R., Seitz, M., Wyler, S.F., Abe, C., Rieken, M., Reich, O., Gasser, T.C., Bachmann, A. (2008). "GreenLight laser vaporization of the prostate: single-center experience and long-term results after 500 procedures." *Eur Urol* 54(4): 893-901.

Weigert, O., Pastore, A., Rieken, M., Lang, N., Hiddemann, W., Dreyling, M. (2007) "Sequence-dependent synergistic efficacy of the proteasome inhibitor bortezomib and cytarabine in mantle cell lymphoma". *Leukemia* 21(3):524-8

Danksagung

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Martin Dreyling als Doktorvater für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Möglichkeit der Promotion sowie die Überlassung dieses interessanten und spannenden Themas.

Herrn Dr. med. Oliver Weigert als stets hilfsbereiten Betreuer.

Meinen Kollegen im Labor Frau Dr. Grit Hutter, Dr. Marc Weinkauf, Dr. med. Alessandro Pastore sowie allen Mitgliedern der KKG Leukämie, die in den vielen Stunden im Labor nicht nur zu guten Kollegen sondern auch zu Freunden wurden.

Danken möchte ich schließlich meinen Eltern Sabine und Jan-Michael Rieken, die mich während des Studiums wie auch im Rahmen der Promotion stets unterstützt haben.