
Molekular gezielte Therapiestrategien beim Mantelzelllymphom Unter besonderer Berücksichtigung des B-Zell-Rezeptor-Signalpfades

Markus Richard Irger



München 2021

Aus der Medizinischen Klinik III
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Univ. Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt-Baildon

**Molekular gezielte Therapiestrategien
beim Mantelzelllymphom
Unter besonderer Berücksichtigung des
B-Zell-Rezeptor-Signalpfades**

Markus Richard Irger

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

vorgelegt von
Markus Richard Irger
aus Altötting

München, 2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Dreyling

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralf Schmidmaier
Prof. Dr. Sebastian Kobold
Prof. Dr. Irene Schmid

Mitbetreuung durch den

Promovierten Mitarbeiter: Dr. Grit Hutter

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2021

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
TABELLENVERZEICHNIS	10
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	11
1. EINLEITUNG	13
1.1. DAS MANTELZELLYMPHOM	13
1.1.1. <i>Definition und Epidemiologie</i>	13
1.1.2. <i>Diagnostik</i>	14
1.1.3. <i>Pathogenese</i>	15
1.1.3.1. Der B-Zell-Rezeptor-Signalweg	16
1.1.3.2. Das Microenvironment.....	17
1.1.4. <i>Therapie des Mantelzelllymphoms</i>	19
1.1.4.1. Übersicht.....	19
1.1.4.2. Cytarabin (Ara-C).....	21
1.1.5. <i>Molekular zielgerichtete Therapeutika</i>	21
1.1.5.1. Abemaciclib (LY2835219)	21
1.1.5.2. Ibrutinib (PCI-32765)	22
1.1.5.3. Idelalisib (Cal-101, GS-1101).....	23
1.1.5.4. Copanlisib (BAY 80-6946)	24
1.1.5.5. Plerixafor (AMD 3100)	25
2. ZIELE DIESER ARBEIT.....	26
3. MATERIAL UND METHODEN	27
3.1. MATERIAL.....	27
3.1.1. <i>Zelllinien</i>	27
3.1.2. <i>Inhibitoren und Zytostatika</i>	27
3.1.3. <i>Zellkultur</i>	28
3.1.4. <i>ViCell</i>	28
3.1.5. <i>Durchflusszytometrie</i>	29
3.1.6. <i>Medium-Throughput-Assay</i>	29
3.1.7. <i>Western Blot</i>	30
3.1.8. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	33
3.1.9. <i>Reagenzien, Puffer und Lösungen</i>	34
3.1.10. <i>Geräte</i>	35

3.1.11. Software.....	36
3.2. METHODEN.....	36
3.2.1. Zellkultur.....	36
3.2.1.1. MCL-Zellen.....	36
3.2.1.2. Feederlayerzellen.....	37
3.2.1.3. Versuchsansätze mit und ohne Feederlayer-Ko-Kultur.....	38
3.2.2. Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung am Vi-Cell.....	39
3.2.2.1. Beckman Coulter Vi-Cell.....	39
3.2.2.2. Zählversuche.....	39
3.2.3. Durchflusszytometrie (FACS).....	41
3.2.4. One-Glo Luciferase Assay.....	42
3.2.5. MACS und Western Blot.....	43
3.2.5.1. MACS – Magnetic Activated Cell Sorting.....	43
3.2.5.2. Proteingewinnung.....	44
3.2.5.3. Western Blot.....	45
3.2.6. PCR und Sequenzierung.....	47
3.2.7. Auswertung der Ergebnisse.....	48
3.2.7.1. Allgemeine und statistische Analyse.....	48
3.2.7.2. Kombinationsversuche.....	49
4. ERGEBNISSE.....	50
4.1. SINGLE-ANSÄTZE.....	50
4.1.1. Abemaciclib.....	50
4.1.1.1. Vi-Cell Zählversuche.....	50
4.1.1.2. One-Glo Luciferase Assay.....	52
4.1.1.3. Apoptose-FACS.....	53
4.1.1.4. MACS und Western Blot.....	55
4.1.2. Ibrutinib.....	60
4.1.2.1. Vi-Cell Zählversuche.....	60
4.1.2.2. One-Glo Luciferase Assay.....	62
4.1.2.3. Apoptose-FACS.....	63
4.1.2.4. MACS und Western Blot.....	63
4.1.3. Cytarabin.....	68
4.1.3.1. Vi-Cell Zählversuche.....	68
4.1.3.2. One-Glo Luciferase Assay.....	70
4.1.3.3. Apoptose-FACS.....	71
4.1.4. Idelalisib, Copanlisib, Plerixafor.....	72

4.1.4.1. One-Glo Luciferase Assay Idelalisib.....	72
4.1.4.2. One-Glo Luciferase Assay Copanlisib.....	73
4.1.4.3. One-Glo Luciferase Assay Plerixafor.....	74
4.2. KOMBINATIONEN.....	75
4.2.1. <i>Abemaciclib und Ibrutinib</i>	75
4.2.1.1. One-Glo Luciferase Assay mit dem murinen Feederlayer.....	75
4.2.1.2. One-Glo Luciferase Assay mit dem humanen Feederlayer.....	77
4.2.2. <i>Abemaciclib und Plerixafor</i>	78
4.2.3. <i>Ibrutinib und Cytarabin</i>	79
4.2.3.1. One-Glo Luciferase Assay.....	79
4.2.3.2. Zählversuch und Apoptose-FACS.....	81
4.2.4. <i>Ibrutinib und Plerixafor</i>	84
4.2.5. <i>PI3K-Inhibitoren</i>	85
4.2.5.1. Idelalisib und Cytarabin.....	85
4.2.5.2. Idelalisib und Plerixafor.....	86
4.2.5.3. Copanlisib und Plerixafor.....	88
4.2.6. <i>Plerixafor und Cytarabin</i>	88
4.3. PCR UND SEQUENZIERUNG DER HRV-1-DNA.....	90
5. DISKUSSION.....	91
5.1. VERGLEICH DER FEEDERLAYER.....	92
5.2. SINGLE-THERAPIE.....	93
5.2.1. <i>Cytarabin</i>	93
5.2.2. <i>Abemaciclib</i>	94
5.2.3. <i>Ibrutinib</i>	98
5.2.4. <i>Idelalisib</i>	102
5.2.5. <i>Copanlisib</i>	103
5.2.6. <i>Plerixafor</i>	103
5.3. KOMBINATIONSTHERAPIE.....	104
5.3.1. <i>Cytarabin und Ibrutinib</i>	104
5.3.2. <i>Cytarabin und Idelalisib</i>	106
5.3.3. <i>Cytarabin und Plerixafor</i>	107
5.3.4. <i>Ibrutinib und Plerixafor</i>	107
5.3.5. <i>Idelalisib und Plerixafor</i>	108
5.3.6. <i>Copanlisib und Plerixafor</i>	109
5.3.7. <i>Abemaciclib und Ibrutinib</i>	109

5.3.8. <i>Abemaciclib und Plerixafor</i>	111
5.4. ÜBERSICHT UND AUSBLICK	112
6. ZUSAMMENFASSUNG	113
7. LITERATURVERZEICHNIS	115
DANKSAGUNG	123
LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATM	ataxia telangiectasia mutated
BAFF	b-cell activating factor
BCR	B-Zell-Rezeptor
BTK	Brutons-Tyrosin-Kinase
bzw.	beziehungsweise
CAM-DR	Cell-Adhesion-Mediated-Drug-Resistance
CDK	cyclin dependent kinase
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
DNA	Desoxyribonucleinacid
EBV	Epstein Barr Virus
ECOG	Eastern-Cooperative-Oncology-Group
EZ	eingenistete Zellen (Zellfraktion in der Ko-Kultur von MCL und FL)
FACS	Fluorescence activated Cell Sorting
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FL	Feederlayer
FP	Fractional Product
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
Ki67	Kiel-67 Protein
LDH	Lactatdehydrogenase
luc	mit Luciferase transfizierte Zelllinie
MACS	Magnetic activated Cell Sorting
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCL	Mantelzelllymphom
MIPI	Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index
mTOR	mammalian target of rapamycin
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
Nr.	Nummer

OG	One-Glo Luciferase Assay
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol(4,5)P ₂
PIP ₃	Phosphatidylinositol(3,4,5)P ₃
RNA	Ribonucleinacid
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SYK	spleen tyrosine kinase
Tab.	Tabelle
TNF α	Tumornekrosefaktor α
u.a.	unter anderem
ÜS	Überstand (Zellfraktion in der Ko-Kultur von MCL und FL)
VEGF	vaskular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot

Tabellenverzeichnis

Tab.	Seite	Inhalt
1	78	Fractional Products der OG mit Abemaciclib und Ibrutinib
2	78	Fractional Products der OG mit Abemaciclib und Plerixafor
3	80	Fractional Products der OG mit Ibrutinib und Cytarabin
4	86	Fractional Products der OG mit Idelalisib und Cytarabin
5	87	Fractional Products der OG mit Idelalisib und Plerixafor
6	90	Ergebnisse HRV-1-DNA PCR und Sequenzierung

Abbildungsverzeichnis

Abb.	Seite	Inhalt
1	14	Zytologische Varianten des MCL
2	17	Der B-Zell-Rezeptor-Signalpfad
3	20	Übersicht über die Therapieempfehlungen
4	42	FACS-Analyse JeKo-1 – Setzen der Gates
5	46	Western Blot Ladekontrolle mit GAPDH
6	51	Zellzahlbestimmung unter Abemaciclib
7	53	OG Abemaciclib
8	54	Apoptose unter Abemaciclib
9	55	Viabilität unter Abemaciclib
10	56	WB ph-Rb und Rb unter Abemaciclib
11	57	WB CDK 2 unter Abemaciclib
12	57	WB cMyc unter Abemaciclib
13	58	WB ph-AKT, AKT, ph-Raptor, Raptor unter Abemaciclib
14	59	WB ph-p44/42-MAPK und p44/42-MAPK unter Abemaciclib
15	60	Zellzahlbestimmung unter Ibrutinib
16	61	Rate an eingesteten MCL-Zellen unter Ibrutinib
17	62	OG Ibrutinib
18	63	Apoptose unter Ibrutinib
19	64	WB ph-BTK und BTK unter Ibrutinib
20	65	WB ph-MEK 1/2, MEK 1/2, ph-p44/42-MAPK, p44/42-MAPK unter Ibrutinib
21	66	WB p100 und p52 NFκB ₂ unter Ibrutinib
22	66	WB ph-AKT und AKT unter Ibrutinib
23	67	WB Caspase 8, Caspase 3, PARP unter Ibrutinib
24	68	Zellzahlbestimmung unter Cytarabin
25	69	Viabilität unter Cytarabin
26	70	OG Cytarabin
27	71	Apoptose unter Cytarabin
28	73	OG Idelalisib
29	73	OG Copanlisib
30	74	OG Plerixafor

Abb.	Seite	Inhalt
31	76	OG Abemaciclib und Ibrutinib
32	77	OG Abemaciclib und Ibrutinib
33	80	OG Ibrutinib und Cytarabin
34	81	OG Ibrutinib und Cytarabin
35	82	Zellzahlbestimmung unter Ibrutinib und Cytarabin
36	83	Apoptose unter Ibrutinib und Cytarabin
37	84	OG Ibrutinib und Plerixafor
38	85	OG Idelalisib und Cytarabin
39	87	OG Idelalisib und Plerixafor
40	88	OG Copanlisib und Plerixafor
41	89	OG Cytarabin und Plerixafor

1. Einleitung

1.1. Das Mantelzelllymphom

1.1.1. Definition und Epidemiologie

Das Mantelzelllymphom (MCL) ist ein seltener Vertreter der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (B-Zell-NHL) mit einem Anteil von etwa 6 % an allen NHL [1] und ist seit 1992 als eigenständige Entität definiert [2]. Man unterscheidet eine klassische von einer blastoiden Variante, letztere geht mit einem schlechteren Überleben einher. Die meisten Patienten haben bei Diagnosestellung eine fortgeschrittene Erkrankung mit einem Stadium III oder IV nach Ann Arbor. [3]

Die Non-Hodgkin-Lymphome stellen etwa 90 % aller Lymphome dar, davon wiederum sind ungefähr 90 % B-Zell-Lymphome. Das Mantelzelllymphom hat einen Anteil von etwa 6 % aller B-Zell-NHL.

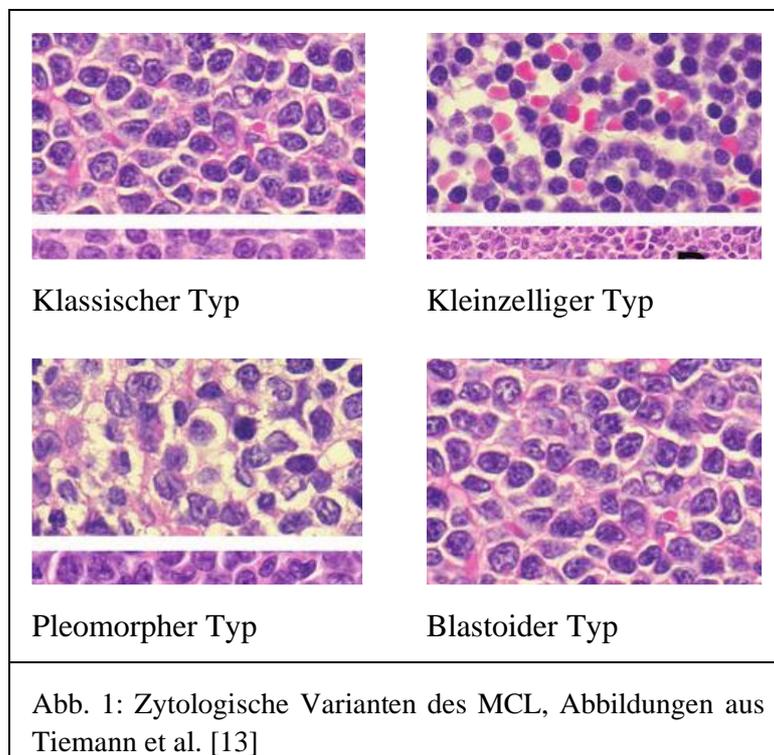
Die Inzidenz des MCL in Europa beträgt 0,45/100.000 pro Jahr [4], in den USA wird die Inzidenz mit 0,55 – 0,8/100.000 pro Jahr angegeben. Dabei zeigen die Daten aus den USA einen deutlichen Anstieg der Inzidenz im Zeitraum 2007 bis 2013 im Vergleich zu 2000 bis 2006, wobei dieser durch die verbesserte Diagnose des Mantelzelllymphoms erklärt werden könnte [3, 5]. Männer sind häufiger von der Erkrankung betroffen, das Verhältnis beträgt in den USA 2,35:1 und in Europa 2,37:1 [4]. Das mediane Erkrankungsalter liegt je nach Datengrundlage bei circa 68 Jahren [5]. Das relative Überleben hat sich in der Periode von 2007 bis 2013 im Vergleich zum Zeitraum von 2000 bis 2006 deutlich verbessert. Epperla et al. zeigten einen Anstieg der relativen Überlebensrate nach 5 Jahren von 50,7 % auf 54,5 %. Vor allem in der Gruppe der Stadium IV Erkrankungen nach Ann Arbor (48,0 % auf 55,1 %) und der unter 75-jährigen Patienten konnte diese Verbesserung beobachtet werden. [5]

Das Mantelzelllymphom muss nach wie vor als unheilbar bezeichnet werden. Obwohl sich das mediane Überleben aller Patienten in den letzten 30 Jahren in etwa verdoppelt hat, beträgt es auch aktuell nur 4,8 Jahre [6]. Dennoch hat sich gezeigt, dass es Patienten mit einem indolenteren Verlauf und besseren Überleben gibt. Um diese von den aggressiv erkrankten Patienten zu unterscheiden gibt es verschiedene Möglichkeiten. Zum einen wird der Mantle Cell International Prognostic Index (MIPI) verwendet, welcher Patienten in fortgeschrittenem Erkrankungsstadium in drei Risikogruppen mit signifikant unterschiedlichem Langzeitüberleben einteilen kann [7]. Zum anderen haben verschiedene Einzelparameter für sich einen prognostischen Einfluss gezeigt, so

beispielsweise die Tumorlast, die blastoide Morphologie, der Ki67-Status, die LDH sowie die B-Symptomatik. [8-12]

1.1.2. Diagnostik

Zytologisch und histologisch unterscheidet man den klassischen Typ mit monotonen Zellen, spärlichem blassem Zytoplasma und irregulären Kernen, den kleinzelligen Typ, den pleomorphen Typ und den blastoiden Typ [13, 14] (siehe Abb. 1). Das Mantelzelllymphom exprimiert als Oberflächenmarker das T-Zell Antigen CD 5, das charakteristische Oberflächennmuster von reifen B-Lymphozyten (CD 19, CD 20, CD 22, CD 43, CD 79a) sowie die Antikörperklassen IgM und IgD. Meist sind die Tumorzellen CD 10 negativ [2, 15]. Die heavy chain variable region genes (IGHV) sind in der Regel wie bei B-Zellen vor dem Transit durch das Keimzentrum unmutiert [16]. Die typische und diagnosebeweisende Mutation ist die Translokation t(11;14)(q13;q23), welche zu einer Cyclin D1 Überexpression führt. Durch das breite Spektrum des histologischen und zytologischen Erscheinungsbildes ist es unbedingt notwendig diesen Nachweis zu erbringen. Dazu wird entweder die Cyclin D1 Überexpression mittels Immunhistochemie oder die zugehörige Translokation mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung nachgewiesen [15].



1.1.3. Pathogenese

Die charakteristische und vermutlich meist erste Mutation ist die Translokation t(11;14)(q13;q23), welche das Protoonkogen CCND1 neben den Genlocus für die schwere Kette der Immunglobuline bewegt. Das wiederum führt zu der für das MCL typischen Überexpression von Cyclin D1, welche in normalen B-Lymphozyten nicht nachweisbar ist [17]. Cyclin D1 bindet in seiner Funktion als Zellzyklusregulator an die CDK 4 und 6. Diese phosphorylieren das Retinoblastomprotein 1 und aktivieren dadurch den Transkriptionsfaktor E2F. Dadurch wird Cyclin E und CDK 2 aktiviert und letztlich der Übergang der Zelle von der G₁-Phase in die S-Phase des Zellzyklus eingeleitet [18] [19]. Neben der beschriebenen Translokation gibt es noch weitere Mechanismen die zu einer erhöhten Cyclin D1 Konzentration in der Tumorzelle führen. Es wurde eine Mutation in der 3'-untranslated Region beschrieben, wodurch sich das transkribierte Protein verkürzt und in der Folge eine höhere Halbwertszeit aufweist, was eine höhere Proteinaktivität und Tumoraggressivität bewirkt [20]. Es gibt jedoch auch MCL-typische Lymphome, die keine Cyclin D1 Überexpression aufweisen, was zu dem Schluss führen könnte, dass die Mutation nicht der einzige MCL-initiiierende Schritt ist [19].

Eine ganze Reihe weiterer Mutationen treten beim Mantelzelllymphom ebenfalls gehäuft auf. Dazu gehören chromosomale Veränderungen der Gene der Zellzykluskontrolle, der DNA-Reparatur und des Zellüberlebens. Beispielsweise sind der INK4a/CDK4/RB1 und der ARF/MDM2/p53 Signalweg häufig von Mutationen oder Genverlusten betroffen [21, 22]. Auch der Verlust oder die Mutation des ATM-Gens spielt eine Rolle bei der Dysregulation der DNA-Reparatur und geht mit einer gesteigerten genomischen Instabilität einher [23, 24]. Vervielfältigungen von antiapoptotischen Genen wie BCL2 oder Deletionen proapoptotischer Gene wie BCL2L11 wurden ebenfalls beschrieben [19, 25, 26]. Patienten mit NOTCH1-Mutationen zeigten ein geringeres Überleben, wobei eine NOTCH1-Inhibition die Tumorzellproliferation inhibiert und die Apoptose einleitet [27]. Ein weiteres spezifisches Protein ist SOX11, ein neuronaler Transkriptionsfaktor, welcher in allen MCL, sowohl Cyclin D1 positiven wie negativen Formen, nachgewiesen werden konnte. Da es in anderen lymphatischen Neoplasien nicht exprimiert wird, könnte es zum einen eine Rolle als diagnostischer Biomarker, zum anderen aber auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese des MCL spielen [28, 29].

Neben den erwähnten und vielen weiteren genetischen Mutationen treten beim Mantelzelllymphom auch diverse Fehlregulationen von Signalwegen in der Zelle auf,

die zum Beispiel das Zellüberleben oder die Interaktion mit dem die Zelle umgebenden Microenvironment betreffen. Dazu gehört der PI3K/AKT/mTOR Signalweg ebenso wie der damit eng verknüpfte B-Zell-Rezeptor-Signalweg [19].

1.1.3.1. Der B-Zell-Rezeptor-Signalweg

Eine Gemeinsamkeit der Lymphomzellen des MCL mit normalen gesunden B-Zellen ist der membranständige B-Zell-Rezeptor (BCR) [30]. Dieser wird von den Immunglobulinen codiert [31] und liegt in der Zellmembran im Komplex mit CD79a und CD 79b vor [32]. Nach Bindung eines Antigens an den Rezeptor werden diese Proteine an Tyrosinresten von der assoziierten Tyrosinkinase LYN, einem Mitglied der Src family of kinases, phosphoryliert [33]. Diese Tyrosinreste befinden sich im zytoplasmatischen Teil der Hilfsmoleküle in einer als ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) bezeichneten Region. Durch die Phosphorylierung wird die zytoplasmatische Kinase SYK an das CD 79a – CD 79b – Heterodimer rekrutiert und aktiviert [33, 34]. SYK wiederum setzt zusammen mit LYN und dem aktivierten BCR verschiedene Signalkaskaden in Gang. Dazu gehört auch das Protein BLNK (B-cell linker protein), welches als molekulares Gerüst für verschiedene Signalwege und Kinasen dient [35]. Eine dieser Kinasen ist die Brutons tyrosine kinase (BTK), eine zytoplasmatische Kinase der Tec-Familie [35] die von LYN und SYK aktiviert wird [36]. Auch die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) spielt für die Aktivierung der BTK eine Rolle. Die gesamte Regulation der Phosphorylierung von BTK ist jedoch noch nicht komplett verstanden [35]. Die aktive BTK wiederum phosphoryliert zum einen die Phospholipase C γ 2, was zu einem Calcium-Influx in das Zytoplasma führt und in der Folge mittels NF κ B unter anderem die Transkription verschiedener Proteine bewirkt, die für das Überleben der Zelle von Bedeutung sind [36]. Zum anderen wird der mitogen-activated protein kinase (MAPK) - Signalpfad aktiviert, welcher ebenfalls Wachstum und Überleben der Zelle bewirkt [37].

Ein weiterer Effekt des aktivierten BCRs ist die Stimulation des PI3K/AKT/mTOR-Signalpfades. PI3K ist eine häufig exprimierte intrazelluläre Kinase. Von der im Rahmen dieser Arbeit relevanten Klasse I PI3K lassen sich vier Isoformen unterscheiden: α , β , γ und δ [30]. In B-Lymphozyten wird vor allem die δ -Isoform mit der katalytischen Einheit p110 δ exprimiert [38]. Die Klasse I PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol(4,5)P $_2$ (PIP $_2$) zu Phosphatidylinositol(3,4,5)P $_3$ (PIP $_3$), welches essentiell für die Aktivierung von AKT ist und auch bei der Aktivierung von BTK eine

Rolle spielt. AKT wird von PIP₃ an die Zellmembran rekrutiert und dort von der ebenfalls gebundenen 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK 1) am Thr308-Rest phosphoryliert, was zu einer partiellen Aktivierung führt [39]. AKT nimmt großen Einfluss auf den Zellmetabolismus, die Proliferation und das Überleben [37, 39]. Die komplette Aktivierung von AKT benötigt zusätzlich die Phosphorylierung am Ser473-Rest durch mTORc2. AKT selbst aktiviert wiederum mTORc1, es besteht also ein gewisser Regelkreis, auch wenn dazu noch nicht alle Mechanismen bekannt sind [40]. Auch BTK kann an PIP₃ binden, jedoch ist bei diesem im Gegensatz zu AKT eine Aktivierung auch gänzlich ohne diese Bindung möglich [41]. Möglicherweise spielt PIP₃ eine Rolle bei der Feinregulierung der BTK-Aktivität [38]. In MCL-Zellen konnte eine starke Aktivierung des B-Zell-Rezeptor-Signalpfades gezeigt werden, was seine Bedeutung für die Pathogenese unterstreicht und auf mögliche therapeutische Ansatzpunkte hinweist [34, 42].

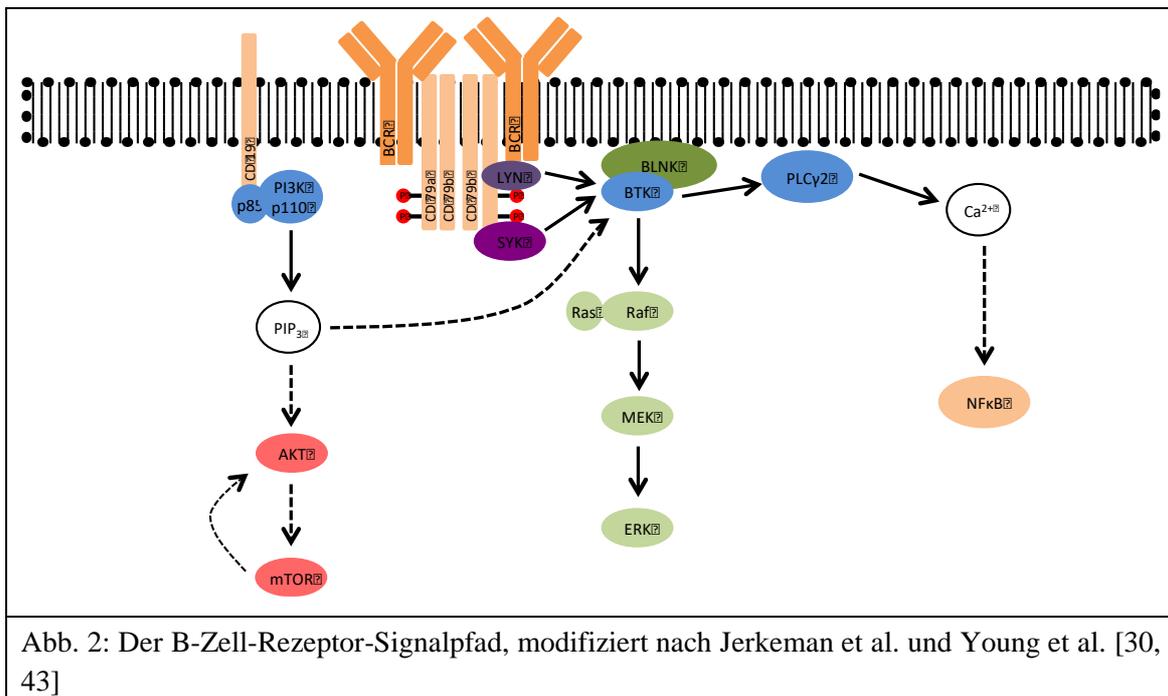


Abb. 2: Der B-Zell-Rezeptor-Signalpfad, modifiziert nach Jerkeman et al. und Young et al. [30, 43]

1.1.3.2. Das Microenvironment

Als Microenvironment werden die Zellen und das Gewebe in der unmittelbaren Umgebung der Tumorzellen bezeichnet. Darunter fallen bei malignen hämatologischen Erkrankungen vor allem das Knochenmark und die lymphatischen Organe [44]. Die Tumorzellen treten dabei sowohl über verschiedene Chemokine und Zytokine als auch direkt mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen in Kontakt [45], wobei längst nicht alle Faktoren bekannt sind. Auch beim Mantelzelllymphom spielt das Microenvironment

eine große Rolle [34, 46]. Schon bei der Tumorentstehung stellt der intensive Kontakt der Stromazellen, Makrophagen oder T-Zellen zu den B-Lymphozyten einen wichtigen Baustein für die maligne Transformation dar. So wird beispielsweise das Wachstum und die Proliferation der Tumorzellen aber auch deren Immunevasion ermöglicht [47].

Ein wichtiger Bestandteil der Kommunikation zwischen den Zellen des Microenvironments und den Lymphozyten beziehungsweise Lymphomzellen sind die Chemokinrezeptoren CXCR 4 und CXCR 5 mit ihren Liganden CXCL 12 und CXCL 13 [45]. Aktivierung dieser Rezeptoren bewirkt unter anderem die Reorganisation des Aktinzytoskeletts als früher Bestandteil der Zellmigration, welche nach Stimulation mit CXCL 12 und 13 nachgewiesen werden konnte. Dass diese starke Zellmigration durch den CXCR 4 Kontakt mit CXCL 12 ausgelöst wird, konnte durch Hemmung von CXCR4 mit dem spezifischen Inhibitor Plerixafor gezeigt werden, was die Migration signifikant verminderte [45, 46]. Ein weiteres zentrales Element für den Einfluss des Microenvironments ist der B-Zell-Rezeptor. Wie dieser direkt aktiviert wird, ist noch nicht in Gänze geklärt. Zum einen könnte eine Autoreaktivität eine Rolle spielen, zum anderen wohl auch die chronische Stimulation durch mikrobielle Erreger [44]. Auch in diesem Fall konnte durch Störung des BCR-Signalweges, zum Beispiel mit dem BTK-Inhibitor Ibrutinib oder durch PI3K/mTOR-Inhibition, der Einfluss des Microenvironments vermindert werden [34, 48]. Die Aktivierung des BCRs steigert wiederum die Expression von CXCR 4 und VLA-4, welche beide die Einnistung in das stromale Gewebe fördern [49]. Des Weiteren wurden verschiedene Cytokine beschrieben, die sowohl parakrin von den Zellen des Microenvironments als auch autokrin von den Lymphomzellen sezerniert werden und die Tumorzellen stimulieren, so zum Beispiel BAFF als Mitglied der TNF α -Familie, VEGF, IL-6 und weitere [34, 50-52].

Für die Einnistung und den unmittelbaren Einfluss der Microenvironment-bildenden Zellen wurden neben der Stimulation der Proliferation und des Überlebens im Allgemeinen noch weitere spezielle Auswirkungen beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen durch das Microenvironment vor verschiedenen zytostatischen Medikamenten geschützt werden und unter anderem signifikant weniger Apoptose zeigen als Lymphomzellen ohne diesen Einfluss. Man bezeichnet das als CAM-DR (Cell-Adhesion-Mediated-Drug-Resistance) [45, 46]. Als direkt darstellbaren Parameter konnte eine Aktivierung des MAP-Kinasen-Signalpfades mit resultierender Phosphorylierung der p44/42 MAPK nachgewiesen werden [45].

1.1.4. Therapie des Mantelzelllymphoms

1.1.4.1. Übersicht

Die Prognose und das Gesamtüberleben von Patienten mit Mantelzelllymphom haben sich in den letzten 30 Jahren deutlich verbessert, es gibt jedoch nach wie vor keinen kurativen Ansatz für die Therapie des Mantelzelllymphoms [5, 6, 16].

Die letztendliche Therapie richtet sich im klinischen Alltag nach dem Alter, dem Allgemeinzustand und dem individuellen Risikoprofil des Patienten, sowie danach ob es sich um eine Ersterkrankung oder ein Rezidiv handelt. Zur Einschätzung der Prognose wird der Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index (MIPI) verwendet, der das Patientenalter, den ECOG-Status zur Evaluierung des Allgemeinzustandes, die LDH-Konzentration und die Leukozytenzahl beinhaltet. Dieser wird um den Ki67-Anteil ergänzt (MIPIc) und erhält dadurch eine sehr gute prognostische Aussagekraft [7, 16, 53].

Bei einem kleinen Anteil der Patienten mit sehr indolentem Verlauf kann man initial eine engmaschige Überwachung im Sinne einer watch-and-wait-Strategie durchführen. Meist ist jedoch auch hier nach wenigen Monaten die Indikation zur medikamentösen Tumorthherapie gegeben [8, 10].

Für die Auswahl des Therapieregimes unterscheidet man zunächst Patienten unter 65 Jahren von älteren Patienten, wobei man für die letztliche Therapieentscheidung immer auch das biologische Alter der Patienten berücksichtigen sollte [16]. Dabei herrscht international keine Einigkeit über die optimale Therapie vor, es gibt verschiedene Protokolle für Patienten im jeweiligen Stadium und Allgemeinzustand, die aber häufig ähnliche Ergebnisse zeigen [9].

In der größeren Gruppe der Patienten über 65 Jahren hat sich das Konzept einer konventionellen Immunochemotherapie mit Rituximab-Erhaltungstherapie durchgesetzt [9, 16]. Neben der etwas aggressiveren Therapie mit R-CHOP (Rituximab + Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon) die auch für schnell progrediente Verläufe geeignet ist, hat sich als Alternative für stärker vorerkrankte Patienten Rituximab + Bendamustin (BR) bewährt. Beide zeigen ähnliche Ergebnisse, bei verlängertem progressionsfreiem Überleben in der BR-Gruppe, die Therapie mit Rituximab und Bendamustin hatte aber weniger Nebenwirkungen [16, 54]. Bei sehr eingeschränkten und stark vorerkrankten Patienten sollten weniger toxische Kombinationen verwendet werden und die Symptomkontrolle im Vordergrund stehen. Beispielsweise wäre eine dosisreduzierte BR-Therapie möglich [55].

Bei jungen und fitten Patienten führt man eine cytarabinhaltige Immunochemotherapie beispielsweise mit R-CHOP und R-DHAP (Rituximab + Doxorubicin, hochdosiertem Cytarabin und Cisplatin) durch. Dem sollte sich eine cytarabinhaltige myeloablative Konditionierungstherapie mit folgender autologer Stammzelltransplantation anschließen [56, 57]. Auch danach wird eine Erhaltungstherapie mit Rituximab empfohlen [58]. Erleiden diese jungen Patienten ein Rezidiv oder eine therapierefraktäre Erkrankung, so sollte eine allogene Stammzelltransplantation erwogen werden [59].

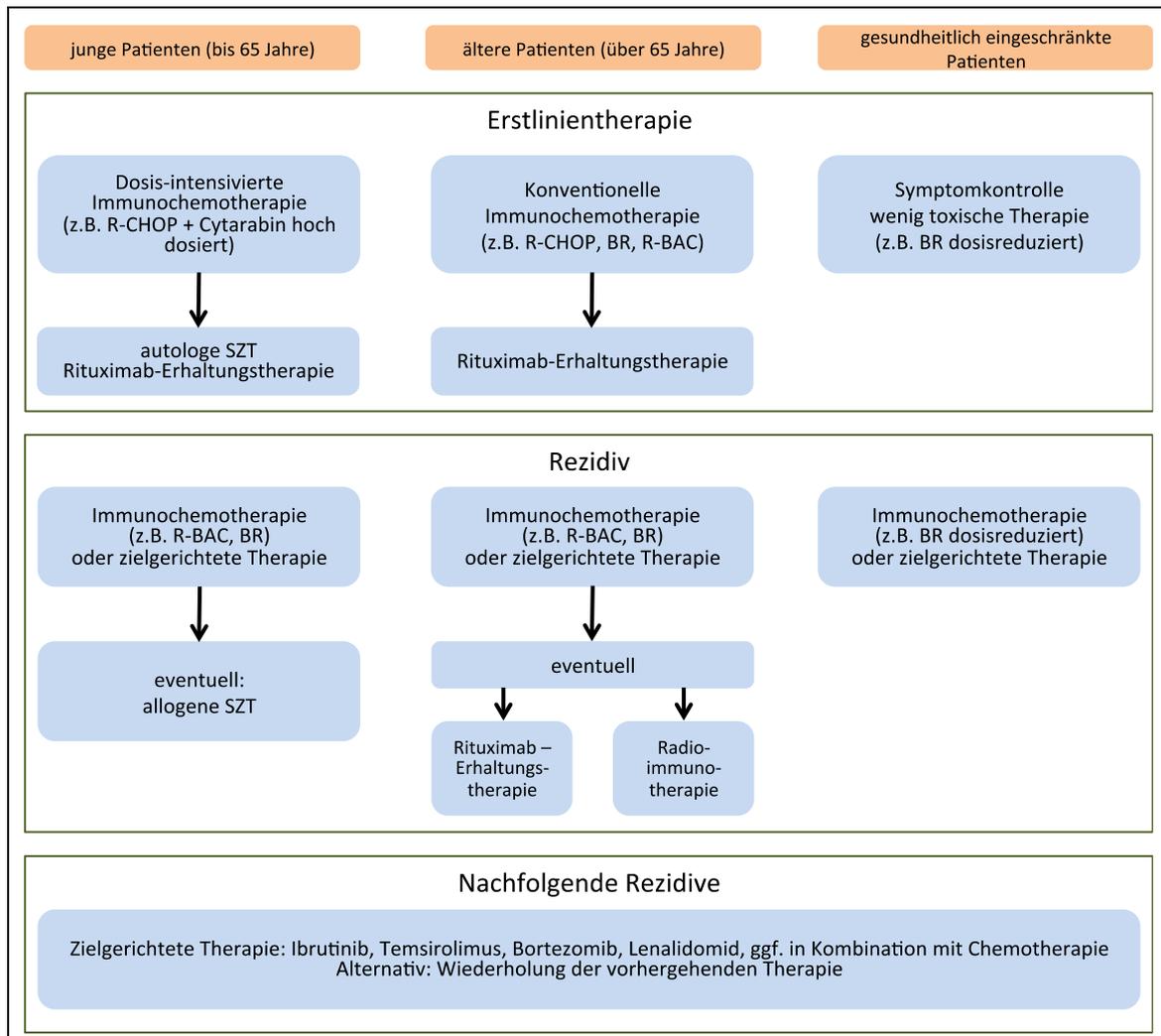


Abb. 3: Übersicht über die Therapieempfehlungen, modifiziert nach Dreyling et al. und Dreyling et al. [16, 55]

Abkürzungen: R-CHOP: Rituximab + Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison; BR: Bendamustin und Rituximab; R-BAC: Rituximab + Bendamustin und Cytarabin; SZT: Stammzelltransplantation; (es sind nicht alle Therapiemöglichkeiten erfasst)

Allgemein zeigt das Mantelzellymphom im Rezidiv häufig einen aggressiveren Verlauf [16]. Bei Patienten die sich nicht für eine allogene Stammzelltransplantation eignen wird daher eine erneute konventionelle Immunochemotherapie häufig in Kombination

mit neuen zielgerichteten Therapeutika durchgeführt. Eine Zulassung beim Mantelzelllymphom haben bisher der Proteasominhibitor Bortezomib, der mTOR-Inhibitor Temsirolimus, der Immunmodulator Lenalidomid sowie der BTK-Inhibitor Ibrutinib [16, 55].

1.1.4.2. Cytarabin (Ara-C)

Cytarabin, auch als Ara-C bezeichnet, ist ein zur Gruppe der Pyrimidin-Antagonisten gehörendes Zytostatikum mit der chemischen Bezeichnung 4-Amino-1- β -D-arabinofuranosyl-1H-pyrimidine-2-on [60]. Der Wirkmechanismus ist nicht abschließend geklärt. Cytarabin hemmt als Triphosphat die DNA-Polymerase durch Verdrängung des physiologischen Substrates Desoxycytidintriphosphat. Des Weiteren wird Cytarabin in die DNA und RNA eingebaut. Letztendlich führt das Medikament zu schweren Schäden an der DNA und den Chromosomen [60]. Somit ist auch verständlich, dass Cytarabin am besten in sich schnell teilenden Tumoren wirkt und wenn sich die meisten Zellen zum Zeitpunkt der Applikation in der S-Phase befinden [60].

1.1.5. Molekular zielgerichtete Therapeutika

1.1.5.1. Abemaciclib (LY2835219)

Abemaciclib, mit der früheren Bezeichnung LY2835219, ist ein von der Firma Lilly entwickelter selektiver CKD 4 / CDK 6 Inhibitor. Die vollständige chemische Bezeichnung lautet [5-(4-Ethyl-piperazin-1-ylmethyl)-pyridin-2-yl]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropyl-2-methyl-3H-benzimidazol-5-yl)-pyrimidin-2-yl]-amine.

Abemaciclib ist oral bioverfügbar und hat in den ersten Analysen bereits eine hohe Selektivität für die Hemmung der CDK 4 und 6 gezeigt [61, 62]. Die Hemmung der Kinasen kommt dabei über eine ATP-kompetitive Hemmung an dessen Bindungsstelle zu Stande [61, 63]. Durch die Inhibition von CDK 4/6 kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme von phosphoryliertem Rb, dem Produkt der aktiven CDK 4/6. Dabei ist eine Hemmung beider Kinasen notwendig, da diese in der Signalkaskade redundant angelegt sind [61, 64]. Durch die verhinderte Phosphorylierung von Rb bleibt der Transkriptionsfaktor E2F blockiert und es resultiert ein suffizienter Zellzyklusarrest in der G₁-Phase [61, 64, 65]. Dieser Effekt konnte sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen werden [61]. In der ersten Phase I Studie

konnten Shapiro et al. eine ausreichende Plasmakonzentration erreichen und eine Hemmung der Rb-Phosphorylierung in der Haut nachweisen. Die häufigsten Nebenwirkungen des Medikaments waren Fatigue, Diarrhoe, Übelkeit, Erbrechen und Neutropenie [62, 66, 67]. Weitere Studien konnten bei Östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinom-Zelllinien eine Zellalterung in Sinne einer Seneszenz sowie eine Apoptose der Zellen bei längerer Behandlung mit Abemaciclib feststellen [64, 67]. Aktuell wird Abemaciclib in verschiedenen klinischen Studien untersucht. Die meisten Studien gibt es zum Mammakarzinom, wie zum Beispiel MONARCH 1, 2 und 3 sowie neuere Generationen [68]. Auch zum nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom sowie zum metastasierten duktalem Adenokarzinom des Pankreas laufen aktuelle klinische Studien [68]. Im September 2017 hat die amerikanische FDA Abemaciclib unter dem Handelsnamen Verzenio die Zulassung zur Therapie von hormonrezeptorpositiven, HER2neu-negativen fortgeschrittenen oder metastasierten Mammakarzinomen nach einem Krankheitsprogress unter endokriner Therapie erteilt. Abemaciclib wird dabei in Kombination mit Fulvestrant, einem Östrogenrezeptorantagonist, verabreicht [68, 69].

1.1.5.2. Ibrutinib (PCI-32765)

Ibrutinib, auch als PCI-32765 bezeichnet, ist ein von den Firmen Celera Genomics und Pharmacyclics entwickeltes small molecule mit einem Molekulargewicht von 440,5 g/mol und der chemischen Bezeichnung 1-((3R)-3-[4-amino-3-(4-phenoxyphenyl)-1-H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl]piperidin-1-yl)prop-2-en-1-one [70]. Seine Entwicklung begann 2007 mit der Suche nach einem kovalenten, irreversiblen Inhibitor für BTK. Zum damaligen Zeitpunkt waren mehrheitlich kompetitive Inhibitoren im Fokus des Interesses, die jedoch den Nachteil der herabgesetzten Wirkung bei hohen ATP-Konzentrationen und die meist geringere Spezifität haben [71, 72]. Die BTK hat in ihrem aktiven Zentrum einen Cytosin-Rest, der in ähnlicher Form nur bei einigen wenigen anderen Kinasen vorkommt, was eine hohe Spezifität gewährleistet. Pan et al. haben bei der Entwicklung eines kovalenten Inhibitors für diesen Cytosinrest verschiedene chemische Strukturen beschrieben, von denen letztlich eine zu Ibrutinib weiter entwickelt wurde [70, 73]. Ibrutinib ist ein potenter, irreversibler Inhibitor der Brutons-Tyrosin-Kinase, der kovalent an einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum der BTK bindet [74]. In den ersten Analysen zeigte sich eine selektive Hemmung der BTK in den B-Zellen, die aktivierte phosphorylierte Form der BTK wurde suffizient gehemmt. Ebenso wurden die direkt Downstream der BTK gelegenen Kinasen AKT,

ERK und PLC γ nicht durch Phosphorylierung aktiviert [34, 74-76]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die autokrine Sekretion von Chemokinen wie IL 8, CCL3/MIP1 α , CCL4/MIP1 β , CCL5/RANTES, TGF1 β , SDF1, APRIL oder BAFF durch Ibrutinib herabgesetzt wird [34, 75, 76]. Die Adhäsion verschiedener Tumorzelllinien in das entsprechende Microenvironment von Stromalen Zellen wurde unter Ibrutinib herabgesetzt [34, 76]. Dies passt zur Beobachtung in späteren klinischen Studien, dass es bei CLL-Patienten nach Beginn einer Ibrutinib-Behandlung zu einer Mobilisation von Tumorzellen und Lymphozyten aus dem lymphatischen Gewebe in das Blut kommt [77]. Bernard et al. sowie Tai et al. konnten darüber hinaus in einigen Zelllinien eine vermehrte Apoptose unter Ibrutinibtherapie nachweisen [34, 75]. In den ersten klinischen Studien bei Patienten mit verschiedenen B-Zell-Malignomen konnte ein deutliches Ansprechen auf die Therapie mit Ibrutinib gezeigt werden. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Diarrhoe, Übelkeit, Fatigue, Ödeme, Atemnot, Neutropenie, sowie Infektionen und kutane Einblutungen [70, 78, 79]. Wang et al. haben in einer internationalen Phase-II-Studie ein sehr gutes Ansprechen von 68 % der Patienten mit rezidiertem Mantelzelllymphom auf die Behandlung mit Ibrutinib gezeigt, woraufhin der Inhibitor 2014 für die Therapie des rezidierten MCL zugelassen wurde [16, 79]. In einer weiteren Phase-III Studie konnte diese Wirksamkeit bestätigt werden. Ibrutinib zeigte eine deutlich höhere Effektivität als Temsirolimus bei rezidierten MCL-Patienten mit einem medianen progressionsfreien Überleben von 14,6 vs. 6,2 Monaten [16, 80]. Auch aktuell laufen noch verschiedene klinische Studien aller Phasen, wobei auch im Hinblick auf beobachtete frühe Ibrutinibresistenzen ein verstärkter Fokus auf Kombinationstherapien mit Ibrutinib liegt [16, 55].

1.1.5.3. Idelalisib (Cal-101, GS-1101)

Idelalisib, früher als Cal-101 oder GS-1101 bezeichnet, ist ein oral bioverfügbares small molecule mit der chemischen Bezeichnung 5-fluoro-3-phenyl-2-[(S)-1-(9H-purin-6-ylamino)-propyl]-3H-quinazolin-4-one. In vitro konnte eine potente selektive Inhibition der p110 δ -Untereinheit von PI3K sowie die Wirksamkeit auf die Signalkaskade durch die Abnahme von phosphoryliertem aktiviertem AKT gezeigt werden [81, 82]. Des Weiteren konnte eine vor allem Caspase-vermittelte gesteigerte Apoptose in verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen werden [81, 82]. Die Interaktion von Tumorzellen der B-Zellreihe mit dem Microenvironment wird von Idelalisib gestört. Unter anderem nimmt die CD40L vermittelte Phosphorylierung von AKT ab und auch

die durch BAFF und TNF α vermittelten Überlebensreize werden inhibiert [81-83]. In einer Phase I Studie mit refraktären oder rezidivierten Mantelzelllymphomen konnte eine gute Gesamtansprechrates von 40 % gezeigt werden. Der Therapieerfolg war aber insgesamt nicht von langer Dauer mit einem medianen progressionsfreien Überleben von nur 3,7 Monaten [84]. Die hauptsächlichen Nebenwirkungen der Therapie waren Diarrhoe, Übelkeit, Fatigue, Fieber, Atemwegsinfekte sowie reversible asymptomatische Erhöhung der ASAT und ALAT [84]. Eine Erklärungsmöglichkeit für die schnell auftretende Idelalisib-Resistenz und das kurze progressionsfreie Überleben könnte die PI3K δ -Selektivität sein, die eine Hochregulierung der PI3K α als Resistenzmechanismus nach sich zieht [30]. Demzufolge sind auch für Idelalisib weitere klinische Studien notwendig, um auch die Möglichkeiten einer Kombinationstherapie weiter zu evaluieren [30].

1.1.5.4. Copanlisib (BAY 80-6946)

Copanlisib, mit der alternativen Bezeichnung BAY 80-6946, ist eine von der Firma Bayer HealthCare Pharmaceuticals entwickelte small molecule mit der chemischen Bezeichnung [2-amino-N-[7-methoxy-8-(3-morpholinopropoxy)-2,3-dihydroimidazo[1,2-c]quinazolin] [85]. Copanlisib ist ein pan-PI3K-Klasse-I-Inhibitor und zeigt dabei seine Hauptwirkung auf die p110 α sowie die p110 δ Untereinheit [85, 86]. In den ersten Analysen konnte sowohl in vitro als auch in vivo eine potente PI3K α und δ Inhibition mit Hemmung der Aktivierung nachfolgender Kinasen in der Signalkaskade, wie zum Beispiel AKT, gezeigt werden. Auch die Zellproliferation wurde suffizient inhibiert [85]. Durch die kombinierte α und δ Inhibition könnte die frühe Resistenz, die unter Idelalisib, dem reinen PI3K δ -Inhibitor, beobachtet wird, eventuell verhindert werden [30]. Die bisherigen klinischen Studien zeigten ein akzeptables Nebenwirkungsprofil, die häufigsten waren dabei Übelkeit, transiente Hyperglykämien, Hypertonie, Diarrhoe, Fatigue, Neutropenie sowie Infektionen [86-88]. Der Inhibitor wurde bei verschiedenen malignen Erkrankungen klinisch getestet, so unter anderem bei indolenten Lymphomen oder dem Mantelzelllymphom, aber auch bei soliden Tumoren [86-88]. Bei der Subgruppe der Patienten mit MCL zeigte sich in den ersten Ergebnissen ein gutes Gesamtansprechen von 64 % [88]. Im September 2017 wurde Copanlisib unter dem Handelsnamen Aliqopa von der FDA auf Grundlage der Ergebnisse einer Phase II Studie [86, 88] zur Therapie des rezidivierten vorbehandelten Follikulären Lymphoms zugelassen [89]. Aktuell laufen verschieden Studien aller

Phasen zu unterschiedlichen Erkrankungen, beispielsweise eine Phase II Studie zu Kombinationstherapie mit Copanlisib beim indolenten NHL [89].

1.1.5.5. Plerixafor (AMD 3100)

Plerixafor, mit dem Handelsnamen Mozobil und der früheren Bezeichnung AMD 3100, ist eine Bicyclamderivat und spezifischer Antagonist des Chemokinrezeptors CXCR 4 [90]. Der Inhibitor wurde in den 1990er Jahren ursprünglich für die HIV-Therapie entwickelt. Er zeigte in vitro einen inhibierenden Effekt auf CXCR 4 sowohl als Chemokinrezeptor als auch als HIV-1-Corezeptor [91]. In weiteren in vitro Experimenten konnte eine Hemmung der normalerweise durch CXCR 4 Stimulation ausgelösten Actinpolymerisation mit folgender Chemotaxis und Zellmigration durch Plerixafor nachgewiesen werden. Auch die Einnistung von Zellen in einen Stromalen Feederlayer im Sinne eines Microenvironments wurde gehemmt [45, 90]. Der Inhibitor selbst hat keinen Einfluss auf die Apoptose von Lymphomzellen, wachsen diese jedoch im Verbund mit ihrem Microenvironment, so stört Plerixafor den positiven Einfluss dieses Microenvironments auf das Überleben der Lymphomzellen und deren Apoptoserate steigt an [34]. Dies zeigt auch eine Hemmung der Aktivierung der MAPK auf eine CXCL12-Stimulation durch Plerixafor [45]. In der Kombination mit Cytostatika verstärkt sich deren proapoptotischer Effekt in der Kombination mit dem Inhibitor bei Tumorzellen in Ko-Kultur mit einem Feederlayer [90]. Aktuell wird Plerixafor zur Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen in das Blut vor einer autologen oder allogenen Stammzellspende verwendet [92]. Nichtsdestotrotz wäre eine Kombination von Plerixafor mit anderen Inhibitoren oder Zytostatika eine denkbare Option zur Therapie maligner hämatologischer Erkrankungen [45].

2. Ziele dieser Arbeit

Trotz großer Fortschritte in der Therapie des Mantelzelllymphoms in den letzten Jahrzehnten geht die Erkrankung nach wie vor mit einem kurzen Langzeitüberleben einher. Vor allem Patienten im Rezidiv oder mit einer refraktären Erkrankung haben eine sehr schlechte Prognose. Zur Verbesserung der Therapie dieser Patientengruppe greift man immer mehr auf neue molekular zielgerichtete Therapeutika zurück.

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein in der Therapie des Mantelzelllymphoms neuer CDK 4/6 Inhibitor untersucht werden. Des Weiteren werden auch bereits bekannte und teils im klinischen Einsatz befindliche Inhibitoren des B-Zell-Rezeptor-Signalpfades genauer charakterisiert. Ein besonderer Schwerpunkt liegt dabei auf der Untersuchung des Einflusses des natürlichen Microenvironments des Lymphomes, welches durch einen Stromalen Feederlayer simuliert wird. Insbesondere sollen die Auswirkungen auf das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen untersucht werden. Ebenfalls sollen die Auswirkungen durch Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot dargestellt werden. Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf der Untersuchung der Kombination verschiedener neuer molekular zielgerichteter Inhibitoren untereinander sowie mit dem für die MCL-Therapie essentiellen Zytostatikum Cytarabin. Auch hierbei soll der Einfluss des Microenvironments sowohl auf Proliferation und Überleben der Lymphomzelllinien als auch auf die Wirkung der Inhibitorkombinationen dargestellt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften [93]
Maver-1	Mantelzelllymphom eines 77-jährigen Mannes in leukämischer Phase; gewonnen aus dem peripheren Blut, etabliert 2003; t(11;14)-Translokation +, CyclinD1 +, MYC-Rearrangement, P53 +, EBV - [94]
Z-138	Mantelzelllymphom mit Merkmalen verschiedener lymphoproliferativer Erkrankungen; gewonnen aus einem Knochenmarkspirat; t(11;14)-Translokation +, CyclinD1 +, EBV - ;(initial als B-ALL-Zelllinie aus einem transformierten B-NHL (B-CLL) bezeichnet) [95, 96]
Granta 519	Mantelzelllymphom im Stadium 4 einer 58-jährigen Frau; gewonnen aus dem peripheren Blut, etabliert 1991; t(11;14)-Translokation +, CyclinD1 +, BCL2-Überexpression, EBV + [97]
JeKo-1	Mantelzelllymphom einer 78-jährigen Frau in leukämischer Phase; gewonnen aus dem peripheren Blut; t(11;14)-Translokation -, BCL1/JH-Rearrangement auf molekularer Ebene, CyclinD1 +, P53 -, EBV -[98]
Mino	Mantelzelllymphom einer 68-jährigen Frau in leukämischer Phase; gewonnen aus dem peripheren Blut, etabliert 1997; t(11;14)-Translokation +, CyclinD1 +, EBV - [99]
M2-10B4	Fibroblasten aus dem Knochenmark einer (C57BL/6J X C3H/HeJ) F1 Maus; Laminin +, Kollagen IV +, Kollagen I -, Faktor VIII - [100, 101]
HS-5	Fibroblasten aus dem Knochenmark eines 30-jährigen Mannes, HPV-16 E6/E7 transformiert; exprimiert u.a. G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL 1, 6, 8, 11 [102, 103]

3.1.2. Inhibitoren und Zytostatika

Name	Hersteller
Abemaciclib (LY2835219)	Lilly, Indianapolis, Indiana, USA
Ibrutinib (PCI-32765)	Pharmacyclics Inc., Synnyvale, California, USA
Idelalisib (Cal-101, GS-1101)	Selleckchem, Houston, Texas, USA
Copanlisib (BAY 80-6946)	Bayer Pharma AG, Berlin, Deutschland
Plerixafor (AMD3100)	Selleckchem, Houston, Texas, USA
Cytarabin (AraC)	Apotheke des Klinikums Großhadern, München, Deutschland

3.1.3. Zellkultur

Material	Hersteller	Katalognummer
RPMI 1640 mit L-Glutamin, 2,0 g/l NaHCO ₃	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland	P04-16500
DMEM High Glucose, mit L-Glutamin	ATCC, Manassas, Virginia, USA	30-2002
Trypsin/EDTA Solution 1x	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland	P10-028100
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland	P30-1500
Dimethylsulfoxide (DMSO)	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A3672
Trypanblau Lösung	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	T8154
Puromycin 10mg/ml	Gibco, life technologies, Carlsbad, California, USA	A11138-03
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA	5100-0001
CryoTubes	Thermo Fisher, München, Deutschland	377267
TC-Flasche T25, Suspen.; T75, Suspen.; T25 Stand.; T75 Stand.	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.3910.502; 83.3911.502; 83.3910.002; 83.3911.002
Falcon 15ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	62.554.502; 62.547.254
Well-Plates mit 6, 12, 24 und 96 Wells	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.3920.500; 83.3920; 83.3921.500; 83.3922.500; 83.3924.500
Well-Plates mit 12 Wells	Corning Inc., Corning, New York, USA	353043
96well weiß	Corning Inc., Corning, New York, USA	3917

3.1.4. ViCell

Material	Hersteller	Katalognummer
Vi-Cell Sample Vial	Beckman Coulter, Brea, California, USA	383721
ViCell Reagent Pack	Beckman Coulter, Brea, California, USA	383198

3.1.5. Durchflusszytometrie

Material	Hersteller	Katalognummer
Phosphate Buffered Saline (DPBS) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland	L1825
Ethanol 70%	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland	402815
Binding Puffer	BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, USA	51-66121E
Propidiumiodid-Lösung	Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri, USA	P-4864
RNAse A	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	12091-021
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	X100
Natriumcitrat (Trisodium citrate dihydrate)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	S1804
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, USA	559763
7-AAD	BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, USA	51-68981E
Bovine Serum Albumine Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	8076.4
EDTA 0,5 mM	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland	A4892,0100
Anti-Feeder-Antibodies PE	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-096-094
BD FACS Tubes	BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA	352008

3.1.6. Medium-Throughput-Assay

Material	Hersteller	Katalognummer
OneGlo Luciferase Assay System	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA	E6120

3.1.7. Western Blot

Material	Hersteller	Katalognummer
Complete Lysis-M, EDTA-free	Roche, Mannheim, Deutschland	04719964001
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 und 3	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	P5726; P044
Bio-Rad Protein Assay DyeReagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland	500-0006
Pre-Diluted Protein Assay Standards: BSA Set	ThermoFisher Scientific, Braunschweig, Deutschland	23208
Gelkassetten und zugehörige Kämmen 12-Well	Novex, life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	NC2010; NC3012
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	3029.1
1,5 M Tris (pH 8,8); 1,5 M Tris (pH 6,8)	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland	T21 T20
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	L4509
Ammoniumpersulfate (APS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	A3678
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	T7024
Isopropanol 70 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	CN09
Bolt™, Sample Reducing Agent 10x; LDS Sample Buffer 4x	Novex, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	B0009; B0007
Elektrophorese-Puffer 10x	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland	T18
Protein Marker V	peqlab, Erlangen, Deutschland	27-2210
Membranen	GE Healthcare, Amersham Hybond-P, Freiburg, Deutschland	RPN 303F
Gel Blotting Paper (Filterpapier)	Whatman, Capitol Scientific Inc., Austin, Texas, USA	10426890
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.06009

Material	Hersteller	Katalognummer
Gel-Transfer-Puffer	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland	T0047-5
TBS-Puffer 10x pH 8,0	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland	T03290
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T145.2
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	9127
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	8076
Natriumazid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	K305
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	104070
NET 10x pH 7,7	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland	L000999
Luminol Sodium Salt	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	A4685-5G
p-Couramic Acid	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	C9008
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	216763
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	472301
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	ThermoFisher Scientific, Braunschweig, Deutschland	32106
ECL Prime	Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA	RPN2232
Frischhaltefolie perforiert 30cm x 500m	Wirtschaftslager Klinikum der Universität München, Deutschland	3100241
Eppendorf Tubes 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	0030121023; 0030120086; 0030120094
CEA Blaufilme 100 Blatt	Fisher/Sehner	150651824; 150651318; 150622430
MACS separation columns MS und LS	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-042-201; 130-042-401

Material	Hersteller	Katalognummer
Feeder Removal MicroBeads (mouse)	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-095-531
peqGold Prestained Protein-Marker V	peqlab, Erlangen, Deutschland	PEQL27-2210

SDS-Page Gele

Zusammensetzung	8 % Gel	10 % Gel	12 % Gel	Sammelgel
Aqua bidest	18,5 ml	15,9 ml	13,2 ml	5,5 ml
Rotiphorese Gel 30	10,7 ml	13,3 ml	16,0 ml	1,3 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	10,0 ml	10,0 ml	10,0 ml	
1,5 M Tris (pH 6,8)				1,0 ml
10 % SDS	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,08 ml
10 % APS	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,08 ml
TEMED	0,024 ml	0,016 ml	0,016 ml	0,008 ml

Antikörper

Name	Molekulargewicht	Hersteller	Quelle	Verdünnungen
GAPDH	37	Santa Cruz	Mouse	1:10000; 1:25000; 1:50000; 1:100000
beta-Actin	45	Sigma Aldrich	Rabbit	1:10000
AKT	60	Cell Signaling	Rabbit	1:1000
BTK	77	Cell Signaling	Rabbit	1:500
c-Myc	57, 70	Cell Signaling	Rabbit	1:500
Caspase 3	17, 19, 35	Cell Signaling	Rabbit	1:500
Caspase 8	10, 57	Cell Signaling	Rabbit	1:500
CDK 2	33	Cell Signaling	Rabbit	1:500
CDK 4	30	Cell Signaling	Mouse	1:500
Cyclin D1	36	Cell Signaling	Mouse	1:500
MEK 1/2	45	Cell Signaling	Rabbit	1:1000
p100/52 NFκB2	52, 100	Cell Signaling	Rabbit	1:500
p44/42 MAPK	42, 44	Cell Signaling	Rabbit	1:1000
PARP	89, 116	Cell Signaling	Rabbit	1:500
ph-AKT (Ser ³⁰⁸)	60	Cell Signaling	Rabbit	1:500
ph-AKT(Thr ⁴⁷³)	60	Cell Signaling	Rabbit	1:500
ph-BTK (Tyr ²²³)	77	Cell Signaling	Rabbit	1: 250; 1:500
ph-MEK 1/2	45	Cell Signaling	Rabbit	1:500
ph-p44/42 MAPK	42, 44	Cell Signaling	Rabbit	1:500
ph-Raptor	150	Cell Signaling	Rabbit	1:500
ph-Rb (Ser 795)	110	Cell Signaling	Rabbit	1:500

Name	Molekulargewicht	Hersteller	Quelle	Verdünnungen
PLC γ	150	Cell Signaling	Rabbit	1:500
Raptor	150	Cell Signaling	Rabbit	1:500
Rb	110	Cell Signaling	Rabbit	1:500

Hersteller: Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
 Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
 Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, Texas, USA

3.1.8. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Material	Hersteller	Katalognummer
DPBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	14040-166
Nucleospin Blood Quick Pure (DNA purification kit)	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	740569
Vorwärtsprimer HRV-1: mtReg-F1 [104]	Sequenz: 5'-TCC-ACC-ATT-AGC-ACC-CAA-AGC-3'	
Rückwärtsprimer HRV-1: mtReg-R1 [104]	Sequenz: 5'-TCG-GAT-ACA-GTT-CAC-TTT-AGC-3'	
100 bp DNA Ladder	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA	G210
Blue/Orange 6x Loading dye	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA	G190
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland	L0112-01
dNTP Set (100mM)	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	10297-018
GeneAmp 10X PCR Gold Buffer and MgCl ₂	Applied Biosystems, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	4379874
TAE Puffer 10x, pH 8,0	Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland	T0021
1% Agarose Gel: Agarose, LE, Analytical Grade	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA	V3125
Ethanol absolute for analysis EMSURE ACS, ISO, Reag. PhEur	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.00983.1000

Material	Hersteller	Katalognummer
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	28104

3.1.9. Reagenzien, Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Aqua bidest (Millipore)	Laboreigene Anlage
G-Net	1,25g Gelatine + 50ml NET 10x + 450ml Aqua bidest
NET 10x pH 7,7	438,30g NaCl + 93,60g EDTA-2Na-2H ₂ O (Titriplex III) + 302,85g Tris + 25,0g Tritin X-100 zu 5l mit gereinigtem Wasser aufgefüllt
Einfriermedium	92% FBS + 8% DMSO
TBST-Puffer	900ml Aqua bidest + 100ml TBS-Puffer + 1ml Tween 20
1,5M Tris-HCl pH 8,8 und pH 6,8	908,55g Tris zu 5l mit gereinigtem Wasser aufgefüllt; pH mit Hcl eingestellt
Elektrophorese-Puffer 10x	151,4g Tris + 720,65g Glycin + 50,0g Natriumdodecylsulfat (SDS-4 Na) zu 5l mit gereinigtem Wasser aufgefüllt
Gel-Transfer-Puffer	15,0g Tris (0,25M) + 71,0g Glycin + 790g Methanol zu 5l mit gereinigtem Wasser aufgefüllt
TAE-Puffer 10x pH 8,0	242,30g Tris + 57,10ml 100% Essigsäure + 18,61g EDTA-2Na-2H ₂ O (Titriplex III) zu 5l mit gereinigtem Wasser aufgefüllt
TBS-Puffer 10x pH 8,0	60,57g Tris + 438,30g NaCl zu 5l mit gereinigtem Wasser aufgefüllt
Ery-Lyse-Puffer pH 7,2	8,3g NH ₄ Cl (155mM) + 1,0g KHCO ₃ + 37,0g Titriplex II (EDTA; 0,13mM) zu 1l mit gereinigtem Wasser aufgefüllt
5% Albumin	5mg Albumin Fraktion V + 100ml TBST-Puffer + 1 Spatelspitze Natriumazid
5% Milch	5mg Milchpulver + 100ml TBST-Puffer
PI-Puffer	500ml Aqua bidest + 40ml Propidiumiodid + 500 µl Triton X + 500mg Natriumcitrat mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt
SA	100mg Luminol + 26,67ml 1,5M Tris pH 8,8 + 373,3ml Aqua bidest
SB	44mg p-Couramin Acid + 40ml DMSO
Selfmade ECL	3ml SA + 300µl SB + 0,9µl H ₂ O ₂

3.1.10. Geräte

Gerät	Hersteller
Laminar-Flow Klasse II Sicherheitswerkbank S-1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
CO2-Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Bestrahlungsanlage Gammacell 40	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Vi-Cell XR	Beckman Coulter, Brea, California, USA
Zentrifuge Rotanta 46 RC	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Großkühlschrank	tritec, Hannover, Deutschland
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
ELISA-Reader GloMax GM3000	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Blockthermostat BT1302	DITABIS AG, Pforzheim, Deutschland
Elektrophoresekammer Xcell SureLock Mini-Cell	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, California, USA
MACS Multi Stand	Milteny Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MidiMACS Separator	Milteny Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MiniMACS Separator	Milteny Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Rollermixer RM5	Hecht Assistent, Sondheim/Rhön, Deutschland
Schüttler KS 260 Basic	Ika-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Fusion-SL	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Optimax Entwicklungsmaschine	Protec GmbH & Co.KG, Oberstenfeld, Deutschland
NanoDrop 1000 Spectrometer	peqlab, Erlangen, Deutschland
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosciences, Life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
E-BOX VX5	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Filtrierpumpe PC 500	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland

Gerät	Hersteller
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc. Bohemia, New York, USA
Pipetman P1000L, P200L, P20L, P2L	Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Transferpipette S8	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen	Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Multipipette M4	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Spitzen Multipipette 0,5ml, 1ml, 5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Glaspipetten Costar Stripette 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Corning Inc., Corning, New York, USA

3.1.11. Software

Software	Hersteller
Microsoft Office 2011 for Mac sowie Microsoft Office 2011 (Excel, Word, Powerpoint)	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Endnote X7.7.1	Thomson Reuters, New York City, New York, USA
FlowJo	FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA
Irfan View	Irfan Skiljan, Wiener Neustadt, Österreich
ViCell Software 2.03	Beckman Coulter, Brea, California, USA
ImageJ	Wayne Rasband, Open Source
Fusion Capt Advance	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
ClustalW 2.1	www.clustal.org [105]
IBM SPSS Statistics Version 21.0.0.0	IBM Corp., Armonk, North Castle, New York, USA

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

3.2.1.1. MCL-Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in der Sicherheitswerkbank durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die humanen MCL-Linien Maver-1, Z-138, Granta 519, JeKo-1 sowie Mino verwendet. Die Zellen wurden von der Deutschen

Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig bezogen. Unter 3.1.1. ist eine Übersicht der Eigenschaften aufgeführt. Alle Zelllinien des Mantelzelllymphoms wurden in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum in geeigneten Suspensions-Zellkulturflaschen kultiviert. Im Inkubator herrschten konstante Bedingungen von 37°C, 5% CO₂ und 95% relative Luftfeuchtigkeit. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen mittels des Vi-Cell auf ihre Viabilität untersucht sowie ihre Konzentration bestimmt. Anschließend wurden sie auf eine an das Wachstum des jeweiligen Zelltyps angepasste Dichte mit frischem Medium verdünnt und weiter inkubiert: (die Werte in Klammern geben die Dichte für drei Tage, die ohne Klammern für zwei Tage Inkubationszeit an) Maver-1 0,6 (0,3) x10⁶/ml, Z-138 0,25 (0,075) x10⁶/ml, Granta 519 0,6 (0,3) x10⁶/ml, JeKo-1 0,35 (0,25) x10⁶/ml, Mino 0,55 (0,3) x10⁶/ml. Die so inkubierten Zellen wurden drei Monate verwendet, anschließend wurden aus einem identischen Stock neue Zellen aufgetaut.

Maver-1, Z-138, Granta 519 und JeKo-1 lagen auch in mit Luciferase transfizierter Form vor. Diese waren von Oliver Weigert und seiner Arbeitsgruppe mittels lentiviraler Infektion mit dem FUW-Luc-mCherry-puro Plasmid transfiziert und somit luziferisiert worden [106]. Zur Selektion der luziferisierten MCL-Zellen wurden diese im Abstand von 4 Wochen jeweils eine Woche mit Puromycin 1µg/ml inkubiert, anschließend mittels zweimaligem Zentrifugieren und Resuspendieren in frischem Medium ohne Puromycin gewaschen und in frischen Flaschen kultiviert. Erst diese Zellen wurden für die Versuche verwendet.

Um die Reinkultur und die Authentizität der MCL-Linien zu überprüfen, wurde eine Analyse der HRV-1 der mitochondrialen DNA der Zellen mittels PCR im eigenen Labor und externer Sequenzierung durchgeführt. [104]

3.2.1.2. Feederlayerzellen

Als Feederlayer (FL) wurden die stromalen Zelllinien M2-10B4 (murin) sowie HS-5 (human) verwendet. Diese wurden unter den identischen Bedingungen wie die MCL-Linien inkubiert, ebenfalls wurde alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Für die M2-10B4 wurde als Medium ebenfalls RPMI 1640 verwendet, für die HS-5 Zellen hingegen DMEM. Hierzu musste zunächst das verbrauchte Medium abgenommen werden, daraufhin wurde in eine TC 75 Kulturflasche 5ml Trypsin hinzugegeben, um die adhärenen Stromazellen vom Boden der Kulturflaschen abzutrypsinieren. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 Minuten wurden die Zellen gut

vermischt, verdünnt und ebenfalls mit dem Vi-Cell auf Viabilität und Konzentration geprüft. Anschließend wurden sie auf eine Zelldichte von $40 \times 10^3/\text{cm}^2$ für zwei Tage beziehungsweise $20 \times 10^3/\text{cm}^2$ für drei Tage mit frischem Medium verdünnt und inkubiert. Auch diese Zelllinien wurden drei Monate verwendet, bevor frische Zellen aufgetaut wurden.

3.2.1.3. Versuchsansätze mit und ohne Feederlayer-Ko-Kultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Versuche jeweils mit und ohne Ko-Kultur der MCL-Zellen mit einem Feederlayer zum identischen Zeitpunkt durchgeführt. In den meisten Fällen wurden die Versuche in Triplicates angelegt um Pipettierfehler sofort zu entdecken und verlässliche Ergebnisse zu erhalten.

Der Feederlayer wurde für jedes Experiment 24 Stunden vor Ansatz des gesamten Versuches vorbereitet. Dazu wurden Stromazellen, welche zuvor zur Verminderung der Proliferationseffizienz mit 20 Gy in einer ^{137}Cs Bestrahlungsanlage bestrahlt worden waren, ausplattiert. Für 6-Well-Platten benötigte man pro Well 5 ml mit einer Konzentration von $0,075 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter, für 12-Well-Platten 2 ml derselben Konzentration, für 96-Well-Platten 100 μl pro Well mit einer Konzentration von $0,1 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter. Die Platten wurden nun über Nacht inkubiert, damit der Feederlayer gut am Boden anhaftet.

In allen Versuchen wurden drei verschiedene Ansätze – a) MCL-Zelllinie in Reinkultur, b) MCL-Zelllinie in Ko-Kultur mit dem Feederlayer, c) Feederlayerzellen in Reinkultur - mit jeweils identischen Inhibitorkonzentrationen angesetzt.

Jede MCL-Zelllinie wurde in Reinkultur genommen (Ansatz a). Die Zellen wurden dazu resuspendiert, am Vi-Cell gezählt, gesplittet und die übrigen Zellen konnten für den Versuch verwendet werden. Sie wurden auf eine zellspezifische Konzentration gebracht und in die entsprechenden Platten gegeben. In der 6-Well-Platte verwendete man 5 ml pro Well, in der 12-Well-Platte 2 ml und in der 96-Well-Platte 100 μl pro Well. Zum Schutz vor Verdunstung wurden in der 96-Well-Platte die äußeren Wells nicht für den Versuchsansatz verwendet, sondern mit reinem Medium befüllt. Dabei wurden folgende Konzentrationen verwendet: Maver-1 $0,2 \times 10^6/\text{ml}$, Z-138 $0,2-0,3 \times 10^6/\text{ml}$, Granta 519 $0,3 \times 10^6/\text{ml}$, JeKo-1 $0,25-0,3 \times 10^6/\text{ml}$, Mino $0,2-0,4 \times 10^6/\text{ml}$.

Auch der Feederlayer wurde in Reinkultur genommen (Ansatz c). Dieser war bereits vom Vortag vorbereitet, so dass nur das Medium abgenommen und durch frisches ersetzt wurde.

Für die Ko-Kultur von Feederlayer und MCL-Zelllinien (Ansatz b) wurde ebenfalls das Medium aus den vorbereiteten Wells abgenommen. Danach wurden die Lymphomzellen in identischen Konzentrationen zur Reinkultur auf den FL ausplattiert. Die bei den jeweiligen Versuchen untersuchten Therapeutika wurden in der Regel in mehreren Konzentrationen verwendet. Um eine genaue Dosierung zu ermöglichen wurde eine ausreichende Menge aus dem Stock entnommen und in einer Verdünnungsreihe die benötigten Konzentrationen hergestellt. Diese wurden anschließend in die Triplicates der drei Fraktionen übertragen.

3.2.2. Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung am Vi-Cell

3.2.2.1. Beckman Coulter Vi-Cell

Das Vi-Cell untersucht die Zellen einer Probe automatisiert mittels der Trypan-Blau-Methode. Diese basiert auf der Membranpermeabilität der Zellen. Bei toten oder sterbenden Zellen steigt die Membranpermeabilität an, sie nehmen Trypanblau auf und werden somit dunkel. Lebende Zellen nehmen weniger Trypanblau auf beziehungsweise schleusen es über aktive Transportprozesse wieder aus und erscheinen somit hell. Das Gerät saugt selbständig die benötigte Probenmenge an, färbt die Zellen durch Zugabe von Trypanblau und analysiert anschließend mittels digitaler Kameraaufnahmen bis zu 100 Bilder. Diese werden von der Systemsoftware in Graustufen überführt und dadurch die Unterscheidung von viablen und nicht viablen Zellen ermöglicht. Danach erfolgt die Reinigung des Systems und die nächste Probe kann analysiert werden. Man erhält somit zuverlässig Messwerte für die Zellkonzentration und die Viabilität der Zellen in der Probe. [107, 108]

3.2.2.2. Zählversuche

In der in 3.2.1.3. beschriebenen Art und Weise wurden die Versuchsansätze in Triplicates sowie in dreifacher Ausführung für die Auswertung nach 24, 48 und 72 Stunden hergestellt. Es wurden reine Zählversuche mit den Inhibitoren Abemaciclib und Ibrutinib sowie dem Zytostatikum Cytarabin mit allen Zelllinien durchgeführt. Bei den Western-Blot und den durchflusszytometrischen Experimenten wurden ebenfalls Zählungen zu den dort gewählten Zeitpunkten durchgeführt. Dadurch erhielt man die Ergebnisse für die Wirkung der einzelnen Inhibitoren sowie der Kombinationen der verschiedenen Therapeutika.

Zur Messung der Zellkonzentration und Viabilität in der Reinkultur der MCL-Zellen wurden diese mittels der Pipette mehrmals durchgemischt und eine ausreichende Menge in ein Vi-Cell Sample Vial pipettiert und am Vi-Cell analysiert.

Für die Analyse der Feederlayerzellen in Reinkultur wurde der Überstand, das heißt in diesem Fall das Medium, nach dreimaligem Spülen mit der Pipette abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin im 6-Well-Plate und 0,5 ml Trypsin im 12-Well-Plate abtrypsiniert. Nach der 5-10-minütigen Inkubationszeit wurde die Trypsinwirkung durch Zugabe von RPMI 1640 Medium beendet und das Ausgangsvolumen von 5 ml im 6-Well-Plate und 2 ml im 12-Well-Plate wieder hergestellt. Nach sorgfältiger Durchmischung, Ablösung und Resuspension der Zellen wurde eine Probe in ein Vi-Cell-Samplevial pipettiert und analysiert.

Bei der Ko-Kultur von Feederlayerzellen und Mantelzelllymphomzellen kann man somit drei Gruppen unterscheiden: a) die MCL-Zellen, die nicht in direktem Kontakt zum FL stehen, sich also im Überstand, dem Medium, befinden (im Folgenden als ÜS bezeichnet); b) die MCL-Zellen, welche sich in den Feederlayer eingenistet haben, also in unmittelbarem Kontakt zu den am Boden adhärenen FL-Zellen stehen (im Folgenden als EZ bezeichnet); c) die Zellen des Feederlayers selbst. Durch die Zellzählung am Vi-Cell kann nur die Zahl der MCL-Zellen im Überstand sowie die Gesamtzahl aus den eingenisteten MCL-Zellen und den FL-Zellen bestimmt werden. Für die Differenzierung nimmt man sich die Feederlayer-Zellen in Reinkultur zu Hilfe. Man nimmt an, dass sich diese, auch in Folge der Bestrahlung, identisch zu den FL-Zellen in Reinkultur verhalten und somit die gleiche Zellzahl vorliegt. Die Zahl der eingenisteten MCL-Zellen selbst wird durch Subtraktion der FL-Zellen in Reinkultur von der Gesamtzahl FL-Zellen + eingenistete MCL-Zellen in Ko-Kultur ermittelt. Philip Irrgang hat diese Methode der Berechnung in seiner Dissertation mittels durchflusszytometrischer Analysen überprüft. Er konnte eine Abweichung der rechnerischen Zellzahlbestimmung von der in der FACS-Analyse ermittelten Zellzahl von durchschnittlich $3,8 \pm 2 \%$ ermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit wird somit die genannte Zellzahlberechnung verwendet. [108] [Hutter, G. et al., unpublizierte Daten]

Für die Messung der MCL-Zellen im Überstand wird wiederum der Überstand nach dreimaligem Spülen mit der Pipette abgenommen und eine Probe am Vi-Cell analysiert. Anschließend werden die am Boden adhärenen FL-Zellen zusammen mit den eingenisteten MCL-Zellen mittels der oben genannten Mengen Trypsin abtrypsiniert und nach der Inkubation durch die Zugabe von Medium das Ausgangsvolumen wiederhergestellt. Nun werden die eingenisteten MCL-Zellen zusammen mit den FL-

Zellen sorgfältig durchmischt und resuspendiert sowie eine Probe am Vi-Cell gezählt und man erhält die Gesamtzahl FL-Zellen + eingenistete MCL-Zellen in Ko-Kultur. Zur Auswertung der erhaltenen Ergebnisse mit Microsoft Excel wurde ein Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle gebildet, die Standardabweichung berechnet und dieses graphisch dargestellt.

Berechnung der Zellzahlen im Zählversuch

$N(\text{MCL in Reinkultur}) = \text{gemessener Wert}$

$N(\text{FL in Reinkultur}) = \text{gemessener Wert}$

$N(\text{MCL(ÜS) in Ko-Kultur}) = \text{gemessener Wert}$

$N(\text{MCL(EZ) + FL in Ko-Kultur}) = \text{gemessener Wert}$

$N(\text{FL in Ko-Kultur}) = N(\text{FL in Reinkultur})$

$N(\text{MCL(EZ) in Ko-Kultur}) = N(\text{MCL(EZ) + FL in Ko-Kultur}) - N(\text{FL in Reinkultur})$

3.2.3. Durchflusszytometrie (FACS)

Der Versuchsansatz wird wie unter 3.2.1.3. beschrieben angelegt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde vor allem die Apoptose verschiedener MCL-Zelllinien unter den Therapeutika Abemaciclib, Ibrutinib und Cytarabin sowie der Kombination von Cytarabin und Ibrutinib untersucht. Die Auswirkung von Abemaciclib auf den Zellzyklus hat Luca Fischer in seiner Dissertation beschrieben [109]. Die Versuche wurden in Triplicates und in 3-facher Ausführung angesetzt, um eine Zellzählung mittels Vi-Cell nach 24, 48 und 72 Stunden durchführen zu können. Die durchflusszytometrische Analyse wurde, wenn nicht anders angegeben, zum Zeitpunkt von 48 Stunden durchgeführt. Die Gewinnung der Proben sowie das Trennen der Zellen aus dem Überstand von den eingenisteten Zellen wurde durchgeführt wie unter 3.2.2.2. beschrieben. Nach Bestimmung der Zellkonzentration wurden je Probe circa 1 Million Zellen in ein FACS-Tube überführt.

Die Vorbereitung der Zellen für die Durchflusszytometrie wurde analog dem Protokoll für die Anti-Feeder-Antibodies von MACS Miltenyi Biotec durchgeführt. Die Zellen werden in den FACS-Tubes bei 300g und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Der flüssige Mediumüberstand wird abgekippt und die Zellen in 100 µl Puffer (PBS mit 0,5% BSA und 2mM EDTA) resuspendiert. Anschließend erfolgt eine erneute

Zentrifugation bei 300g für 10 Minuten. Der Puffer wird abgekippt und das Zellpellet am Boden der Tubes erneut in 100 µl Puffer resuspendiert. Nun erfolgt die Zugabe von 10 µl Anti-Feeder PE Antikörpern, der Inhalt wird mit dem Vortex gemischt und die Tubes für 10 Minuten im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Danach werden die Tubes erneut bei 300g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig aspiriert ohne das Zellpellet zu berühren. Dieses wird nun in 100 µl Puffer resuspendiert und 5 µl 7-AAD hinzugegeben. Die Proben müssen nun 15 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubieren, dann gibt man 400 µl Puffer hinzu, um ein ausreichendes Volumen zur FACS-Analyse zu erhalten. [110]

Die Durchflusszytometrie wurde am FACS Calibur durchgeführt. Durch die Markierung der Feederlayer-Zellen mit dem Anti-Feeder PE Antikörper konnte man die FL-Zellen von den Lymphomzellen unterscheiden. Durch Setzen der entsprechenden Gates am FACS konnte man nun die beiden Zellpopulationen separat auf die Markierung mit 7-AAD und damit den Grad der Apoptose untersuchen. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die Programme FlowJo und Microsoft Excel verwendet.

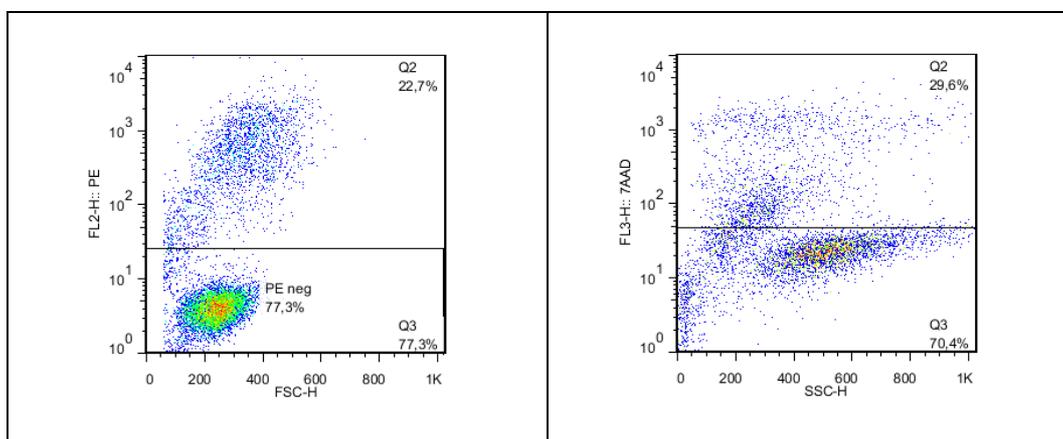


Abb. 4: FACS-Analyse der JeKo-1 mit dem Feederlayer M2-10B4 unter Behandlung mit Cytarabin. Links ist die Analyse der PE-Markierung mit dem gesetzten Gate zur Auswahl der PE-negativen MCL-Zellen abgebildet. Rechts ist die Analyse der 7AAD-Markierung in den zuvor ausgewählten MCL-Zellen gezeigt.

3.2.4. One-Glo Luciferase Assay

Die Luciferase ist ein Enzym mit dem die vier MCL-Zelllinien Maver,-1 Z-138, Granta 519 und JeKo-1 lentiviral transfiziert worden waren (vgl. 3.2.1.1.). Durch die Luciferase wird eine Reaktion des im One-Glo-Reagent (ONE-Glo™ Luciferase Assay System) enthaltenen 5'-Fluoroluciferin zu Oxyfluoroluciferin katalysiert, wodurch Licht emittiert

wird. Somit ist es möglich die der Proliferationsrate dieser Zellen entsprechende Luciferaseaktivität zu detektieren. Die Versuche wurden vorwiegend mit dem murinen Feederlayer M2-10B4 durchgeführt, einige wurden in identischer Wirkstoff- und MCL-Zell-Kombination erneut mit der humanen FL-Zelllinie HS-5 durchgeführt, um zu zeigen, dass die Ergebnisse mit beiden FL-Zelllinien vergleichbar sind. Es wurden die Therapeutika Abemaciclib, Ibrutinib, Idelalisib, Copanilisib, Plerixafor und Cytarabin in verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen untersucht.

Der Versuchsansatz wurde in weißen 96-Well-Platten wie unter 3.2.1.3. beschrieben vorbereitet. Die äußersten Wells wurden mit 100 µl blankem Medium befüllt, ebenso wurde eine innere Reihe mit 100 µl Medium befüllt, diese diente bei der späteren Auswertung der Lumineszenz als Blank. Der dort gemessene Wert wurde von den Messergebnissen der mit Zellen gefüllten Wells abgezogen, um die Messergebnisse verschiedener Platten untereinander vergleichen zu können. Nach Befüllen der Wells mit den MCL-Zellen in Reinkultur sowie in Ko-Kultur mit dem Feederlayer und Zugabe des Inhibitors in den entsprechenden Konzentrationen wurden die Platten inkubiert und nach 48 Stunden der Analyse unterzogen.

Dazu wurden die 96-Well-Platten aus dem Inkubator genommen, dass sie abkühlen können und in etwa Raumtemperatur erreichen. Das One-Glo Reagent wurde zuvor ebenfalls lichtgeschützt auf Raumtemperatur erwärmt. Nun wurde dieses 1:4 mit Aqua bidest. verdünnt. In jedes zu messende Well, einschließlich Blank und der unbehandelten Kontrolle, wurde nun 100 µl One-Glo Reagent pipettiert. Nach 3-minütiger lichtgeschützter Inkubation wurde die Lumineszenz am GloMax gemessen und die Daten anschließend mit Microsoft Excel ausgewertet. [111]

3.2.5. MACS und Western Blot

3.2.5.1. MACS – *Magnetic Activated Cell Sorting*

Um die für den Western Blot benötigten Proteine von nur einer Fraktion der Zellen in Ko-Kultur herstellen zu können, mussten die jeweiligen Zellfraktionen voneinander getrennt werden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem MACS-Verfahren (magnetic activated cell sorting) von Miltenyi Biotec durchgeführt. Das Prinzip der MACS-Technik ist, dass die Stromazellen des Feederlayers mit monoklonalen Anti-Maus-Feeder-Antikörpern an denen kleine magnetische Partikel, sogenannte MicroBeads, befestigt sind, markiert werden. Danach durchlaufen die Proben eine magnetische Säule, wobei die nicht markierten MCL-Zellen hindurchtreten können,

während die magnetisch markierten FL-Zellen in der Säule verbleiben. Nach der Entfernung des Magneten kann man die Stromazellen in einem separaten Gefäß durch einen weiteren Elutionsschritt sammeln und erhält somit die sortierten Zellfraktionen.

Zur Durchführung der Zellseparation wurden die in 6-Well-Plates kultivierten Zellen wie in 3.2.2.2. beschrieben in die Fraktionen Überstand und eingestete MCL + FL getrennt. Die Triplicates werden anschließend zusammengeführt, um auch nach der MACS noch genügend Zellen zur Proteingewinnung zu erhalten. Die Zellzahl in den einzelnen Proben wurde am Vi-Cell bestimmt, anschließend wurden die Proben in Falcons bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand komplett aspiriert. Die Zellpellets wurden in 80 µl Puffer (DPBS mit 0,5% BSA und 2mM EDTA) resuspendiert und 20 µl Feeder Removal MicroBeads hinzugegeben. Die Proben wurden am Vortex gemischt und anschließend 15 Minuten im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die MACS Säulen in den MiniMACS und MidiMACS Separatoren vorbereitet und dabei die MS Columns mit 0,5 ml Puffer, die LS Columns mit 2 ml Puffer gespült. Daraufhin wurden die Proben zum Durchlauf auf die Säulen gegeben, um somit die magnetisch markierten Feederlayerzellen an der Säule zu binden, während die MCL-Zellen in einem neuen Eppendorf-Tube aufgefangen wurden. Danach wurden die MS Säulen mit zweimal 0,5 ml Puffer, die LS Säulen mit zweimal 1 ml Puffer gespült und dieses zur sortierten MCL-Probe hinzugefügt. Anschließend wurden die Säulen von den magnetischen MACS-Separatoren getrennt und erneut (die MS Columns mit 1 ml sowie die LS Columns mit 5 ml Puffer) unter Stempeldruck gespült. Die dabei frei werdenden markierten Zellen wurden in einem separaten Eppendorf-Tube aufgefangen. Von allen erhaltenen sortierten Proben wurde nun noch die Zellkonzentration bestimmt, um die erfolgreiche Sortierung zu kontrollieren und um die nachfolgende Proteingewinnung durchführen zu können. [112]

3.2.5.2. Proteingewinnung

Um die Proteine in guter Qualität zu erhalten, erfolgte die gesamte Arbeit auf Eis. Die Proben in den Eppendorf-Tubes wurden für 10 Minuten bei 2500g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und die Zellpellets entsprechend der zuvor bestimmten Zellzahl in 100 µl pro 1 Mio. Zellen in complete Lysis-M Reagenz aufgelöst. Das Lysat wurde nun für 10 Minuten auf dem Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 14000g und 4°C für 15 Minuten

zentrifugiert und danach der Überstand mit dem Proteinlysate in neue Eppendorf-Tubes überführt. [113]

Nun erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung, um beim späteren Western Blot identische Mengen an Protein laden zu können. Dazu wurden in eine 96-Well Platte 200 μ l pro Well des zuvor 1:5 mit Aqua bidest. verdünnten Bio-Rad Protein Assay Reagenzes vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 μ l BSA Proteinstandard beziehungsweise 1 μ l Proteinlysate. Der Inhalt der Wells wurde vermischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und anschließend die Absorption bei 600 nm im Glomax gemessen. In Microsoft Excel wurde mittels des Proteinstandards eine Standardkurve erstellt und so der Proteingehalt in den Lysaten berechnet.

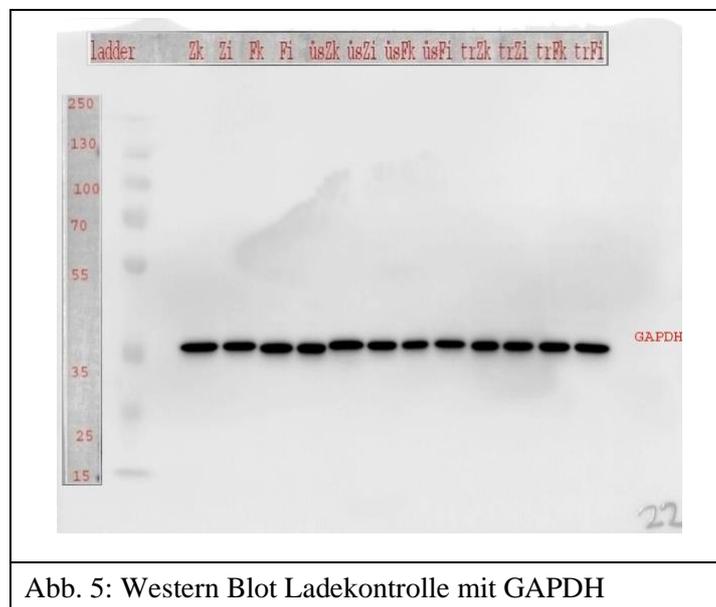
3.2.5.3. Western Blot

Vor dem eigentlichen Western Blot wurden die Laufgele hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden je nach Proteingröße 8%, 10% oder 12% Gele verwendet. Das Trenngel wurde hierzu entsprechend seiner Zusammensetzung hergestellt, in die Gelkassetten gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 Minuten wurde dieses abgegossen und das Sammelgel entsprechende der Zusammensetzung hergestellt. Dieses wurde dann in Kassette gegossen und der benötigte Kamm für die Ladeslots eingesetzt. Nach weiteren 30 Minuten waren die Gele einsatzbereit. In der Zwischenzeit wurden die Proteine vorbereitet. Entsprechend der zuvor bestimmten Proteinkonzentration wurden von jeder Probe 10 μ g Protein mit Loading Dye 4x und Reducing Agent 10x gemischt und für 10 Minuten bei 70°C denaturiert. Die Kämmen wurden aus den Gelen entfernt, die Gelkassette in die Elektrophoresekammern gespannt und diese mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Nun wurden die Slots in den Gelen einmal mit 10 μ l Protein Marker V sowie mit 10 – 20 μ l Probenmaterial gefüllt. Nach komplettem Füllen mit Elektrophoresepuffer wurden die Elektrophorese mit 61 V für 30 Minuten, 81 V für 90 Minuten und 121 V bis zum Ende durchgeführt. Kurz davor wurde die Blotting Kammer vorbereitet. Die Membranen wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten, kurz in Methanol und Aqua bidest getaucht und anschließend in den Gel Transfer Puffer gegeben. In die Kammer wurden 3 Lagen mit Transfer Puffer getränktes Filterpapier gelegt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden nun die Membranen auf das Filterpapier, auf die Membranen die Gele und darauf wieder drei Lagen Filterpapier gegeben. Nachdem alles gut mit Gel Transfer Puffer getränkt worden war, wurde der Blot mit 0,25 A für 2,5 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen in

50 ml Falcons gegeben, in 5% Milk (Milchpulver in TBST gelöst) für 1 Stunde geblockt und danach für 3 x 10 Minuten in TBST gewaschen.

Zur Detektion der Proteine wurden die primären Antikörper in der gewünschten Verdünnung je nach Herstellerangaben in 5% Albumin Fraktion V (in TBST) oder in G-Net gelöst und 2 ml davon mit der Membran über Nacht bei 4°C auf Rollen inkubiert. Danach wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membranen 3 x 10 Minuten mit TBST gewaschen. Der sekundäre Anti-Mouse oder Anti-Rabbit-Antikörper wurde in 5% Milk gelöst und für 1 Stunde auf dem Roller bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranen erneut 3 x 10 Minuten in TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte je nach Stärke des Signals mit Selfmade-ECL, Pierce TM ECL oder ECL Prime am Kamerasystem Fusion SL.

Mit der Fusion Software wurden die Bilder entsprechend belichtet und gespeichert, anschließend wurde das Proteinsignal quantitativ gemessen. Mit diesen Messwerten sowie den entsprechenden Werten der Ladekontrolle GAPDH wurde die Berechnung des Ladekontrolle-korrigierten Verhältnis zur Kontrolle durchgeführt. Dazu wurde zunächst der Messwert jedes gemessenen Proteinsignals in das Verhältnis zur zugehörigen Ladekontrolle gesetzt, um etwaige Unterschiede bei der Beladung mit Protein herauszurechnen. Anschließend wurde mit diesen korrigierten Werten das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle berechnet.



3.2.6. PCR und Sequenzierung

Zur Überprüfung der Authentizität der MCL-Zellkulturen wurde die von Hutter et al. beschriebene Methode der HRV-1-PCR und Sequenzierung angewandt. [104]

Die Gewinnung der benötigten DNA wurde analog dem NucleoSpin Blood Quick Pure Protokoll durchgeführt. Nach der Zellkonzentrationsbestimmung am Vi-Cell wurden Zellpellets mit 2 Millionen Zellen von jeder Lymphomzelllinie erstellt. Diese wurden in 200 µl PBS gelöst und dazu wurden 25 µl Proteinkinase K und 200 µl Lysis Buffer BQ1 gegeben. Die Proben in den Eppendorf-Tubes wurden nun 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Ethanol hinzugefügt und die Proben am Vortex gut gemischt. Nun wurde die DNA an die NucleoSpin Blood QuickPure Columns gebunden. Dazu wurden diese in ein Collection Tube gesetzt, die Proben wurden in die Säulen pipettiert und diese bei 11000g 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Collection Tube gesetzt und 3 Minuten bei 11000g zentrifugiert um die Membran in der Säule zu trocknen. Nun wurde die Säule in ein neues Eppendorf-Tube gesetzt und man gab 50 µl auf 70°C erwärmten Buffer BE auf die Säule, inkubierte dies eine Minute und zentrifugierte anschließend bei 11000g für eine Minute um die DNA aus der Membran zu lösen. [114]

Um die Menge der erhaltenen DNA zu messen wurden 2 µl der erhaltenen Probe auf das Spektrometer gegeben, nachdem man zuvor den Blank-Wert mit BE-Puffer bestimmt hatte.

Die anschließende PCR wurde nach dem im Labor etablierten von Hutter et al. beschriebenen Protokoll durchgeführt. Zur PCR von einer Probe wurden 1 ng extrahierte DNA, je 10 pmol des Vorwärts- und Rückwärtsprimers für HRV-1 zusammen mit 0,25mM von jedem dNTP, 1,25 U Taq-Polymerase, 2,5% DMSO und 2,5 µl GenAmp Gold Buffer in ein PCR-Gefäß gegeben, so dass man ein Volumen von 25 µl erhielt. Es folgte das PCR-Protokoll mit 10 Minuten bei 95°C zur Denaturierung und Enzymaktivierung gefolgt von 35 Zyklen mit jeweils 30 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 60 Sekunden Anlagerung der Primer bei 56°C, 60 Sekunden DNA-Synthese bei 72°C sowie dem Abschluss bei 72°C für 7 Minuten. [104]

Die Auftrennung der DNA erfolgte im 1%-Agarose-Gel. Dafür wurde 1g Agarose LE in 100 ml 1xTAE gekocht bis sich die Agarose vollständig gelöst hat, 10 µl SybrSafe hinzugegeben und das Gel mit eingesetztem Kamm in die Laufkammer gegossen. Nach dem Erkalten wurden die Slots mit der Ladder beziehungsweise mit 5 µl DNA-Sample zusammen mit 1 µl Loading Dye beladen. Die DNA wurde unter einer konstanten

Spannung von 121 V laufen gelassen. Anschließend wurden die DNA-Banden unter dem UV-Licht sichtbar gemacht.

Für die Sequenzierung wurde die benötigte DNA-Bande unter UV-Licht-Kontrolle ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Quiagen Group gewonnen. Die Gelproben wurden gewogen und die dreifache Menge an QG-Puffer zusammen mit den Proben in ein Eppendorf-Tube gegeben und unter wiederholtem vortexen 10 Minuten bei 50°C inkubiert. 150 µl der Proben wurden nun mit 150 µl Isopropanol vermischt und in eine QIAquick spin column gegeben. Diese wurden 1 Minute zentrifugiert, um die DNA zu binden. Anschließend wurden die Proben zuerst mit 500 µl Puffer QG, dann mit 750 µl Puffer PE unter Zentrifugation gewaschen und die Säule noch einmal trocken zentrifugiert. Um die DNA herauszulösen, wurde 50 µl Puffer EB in die Säule gegeben und die DNA in frische Eppendorf-Tubes zentrifugiert. [115]

Diese Samples wurden nun an die Firma Sequiserve GmbH (Johann-Sebastian-Bach-Str. 7, 85591 Vaterstetten, Deutschland) zur Sequenzierung gegeben. Nach Erhalt der Ergebnisse wurden die DNA-Sequenzen mit Hilfe von ClustalW auf die bekannten Mutationen geprüft. Diese waren von Hutter et al. publiziert bzw. später in identischer Art und Weise im Labor bestimmt worden [104] [Hutter, G. et al., unpublizierte Daten].

3.2.7. Auswertung der Ergebnisse

3.2.7.1. Allgemeine und statistische Analyse

Für alle Versuche wurden das Verhältnis oder die Differenz zur unbehandelten Kontrolle sowie die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Diese Werte wurden in Diagrammen dargestellt um damit eine graphische Auswertung und Interpretation zu ermöglichen. Dafür wurde Microsoft Excel verwendet. Darüber hinaus wurde für einige Versuche die Varianzgleichheit der Ergebnisse mit dem Levene-Test untersucht. Anschließend wurde ein T-Test zur Untersuchung der Mittelwertgleichheit durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben wurden Ergebnisse mit einem p-Wert <0,05 als signifikant angesehen. Für die statistischen Tests wurde SPSS verwendet.

3.2.7.2. Kombinationsversuche

Neben der üblichen Berechnung des Verhältnisses zur unbehandelten Kontrolle, der Ermittlung der Mittelwerte und zugehörigen Standardabweichungen sowie der graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde bei den Kombinationen aus zwei Therapeutika noch ein weiteres Verfahren zur Auswertung angewandt. Zwei Therapeutika können sich in Kombination zum einen abschwächen, sie sind a) antagonistisch. Des weiteren können sich die Wirkungen addieren, man bezeichnete die Medikamente dann als b) additiv. Wenn sich die Wirkung in der Kombination mehr als additiv verstärkt, so wurde dies als c) synergistisch bezeichnet. Zur Bestimmung wurde das Fractional Product (FP) verwendet, welcher mittels der Formel nach Webb berechnet wurde [116]. Man benötigte dazu das Verhältnis zur Kontrolle (Ratio to K = R_K) der Single-Ansätze sowie der Kombinationen und berechnet daraus die Verminderung im Vergleich zur Kontrolle (Fraction affected $F_A = 1 - R_K$):

$$FP = 1 - F_A(\text{Substanz A}) \times F_A(\text{Substanz B}) - (1 - F_A(\text{Substanz A} + \text{B}))$$

Fractional Products größer als + 0,1 wurden als synergistisch bewertet, solche kleiner als - 0,1 als antagonistisch. Alle Werte dazwischen wurden als additiv angesehen [116, 117].

4. Ergebnisse

4.1. Single-Ansätze

4.1.1. Abemaciclib

4.1.1.1. Vi-Cell Zählversuche

Die Analyse der Zellzahl und der Viabilität wurden mit den Zelllinien Maver-1, Z-138, JeKo-1 und Granta 519 und den stromalen Zellen M2-10B4 als Feederlayer durchgeführt. Abemaciclib wurde in einer Konzentration von 62,5 nM verwendet und die Messungen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt. Luca Fischer hatte im Rahmen seiner Dissertation die IC50 für Abemaciclib in den verwendeten MCL-Linien bestimmt [109]. Die gewählte Konzentration befindet sich für die meisten Zelllinien in der Nähe ihrer spezifischen IC50, um eine gute aber nicht zu starke Wirkung zu erzielen.

In allen vier Zelllinien konnte zu allen Zeitpunkten eine Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden. Es zeigte sich, außer in der Zelllinie Granta 519, eine unterschiedlich ausgeprägte Inhibition in den verschiedenen Kompartimenten. Diese Differenzen waren meist am deutlichsten in der Messung nach 48 Stunden zu sehen. Am stärksten wurde die Zellzahl in den MCL-Zelllinien in Reinkultur sowie die Zellen im Kompartiment des Überstandes über dem FL vermindert. Bei den in den Feederlayer eingenisteten MCL-Zellen war die Hemmung weniger ausgeprägt. Die Zellen des Feederlayers selbst zeigten keine Hemmung der Proliferation.

Das Verhältnis der behandelten Zellen zur Kontrolle betrug bei den Zellen in Reinkultur nach 48 Stunden zwischen 0,33 und 0,65 (Maver-1: 0,51; Z-138 0,35; Granta 519: 0,65; JeKo-1: 0,33). Die Zellen im Überstand zeigten ein Verhältnis zur Kontrolle zwischen 0,24 und 0,52 (Maver-1: 0,48; Z-138 0,37; Granta 519: 0,52; JeKo-1: 0,24). Bei den eingenisteten Zellen konnte ein Verhältnis zur Kontrolle von 0,55 bis 1,02 gemessen werden (Maver-1: 1,02; Z-138 0,55; Granta 519: 0,59; JeKo-1: 0,75). Die eingenisteten Zellen der Linie Maver-1 schienen hier etwas später anzusprechen, nach 72 Stunden zeigten sie eine Zellzahl von 0,48 im Vergleich zur Kontrolle. Die Linie Granta 519 zeigte insgesamt ein geringeres Ansprechen als die anderen drei MCL-Linien. Für die Werte der Zelllinien Maver-1 und JeKo-1 nach 48 Stunden war der Unterschied zwischen den eingenisteten Zellen und denen im Überstand der Ko-Kultur signifikant

(Maver-1 $p=0,004$; JeKo-1 $p=0,003$). Ebenso war in diesen Zellen der Unterschied zwischen den eingenisteten Zellen im Feederlayer und den Zellen in Reinkultur signifikant (Maver-1 $p=0,004$; JeKo-1 $p=0,003$). Bei den beiden anderen Zelllinien verhinderte eine zu große Standardabweichung (Z-138) beziehungsweise eine zu kleine Gesamtdifferenz (Granta 519) die statistische Signifikanz für die Ergebnisse nach 48 Stunden. Dass auch in diesen MCL-Linien ein relevanter Unterschied zwischen den Zellen des Überstandes und den eingenisteten Zellen bestand, zeigte ein Blick auf die anderen Zeitpunkte. In der Granta 519 bestand ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Kompartimenten zum Zeitpunkt von 24 Stunden ($p=0,002$). Für die Z-138 zeigte sich hier nach 72 Stunden ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p=0,04$). Insgesamt zeigte sich somit ein geringeres Ansprechen der eingenisteten Zellen im Vergleich zu den Zellen im Überstand oder in der Reinkultur.

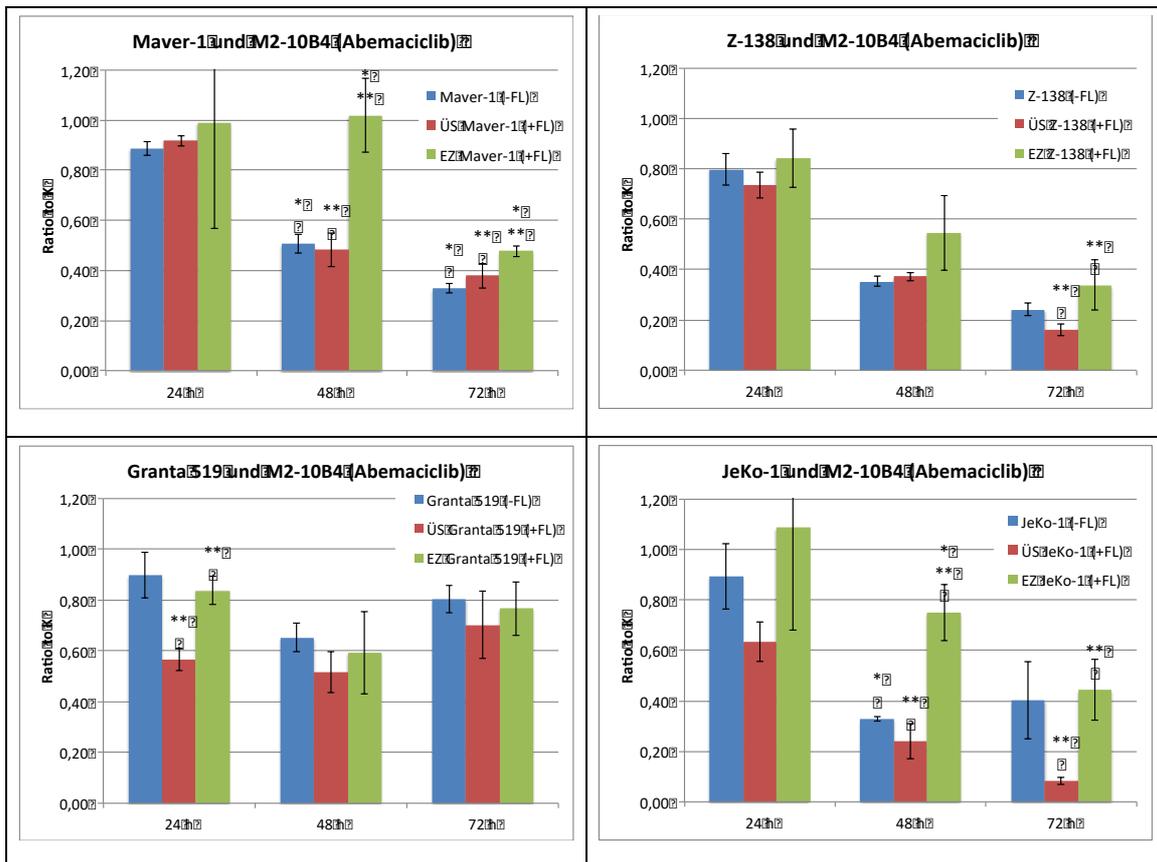


Abb. 6: Zellzahlbestimmung in den MCL-Zelllinien unter Behandlung mit 62,5 nM Abemaciclib in An- und Abwesenheit der M2-10B4-FL-Zellen. Die Messungen erfolgten nach 24, 48 und 72 Stunden am Vi-Cell. Dargestellt ist das Verhältnis der Zellzahl von behandelten Zelllinien zur unbehandelten Kontrolle.

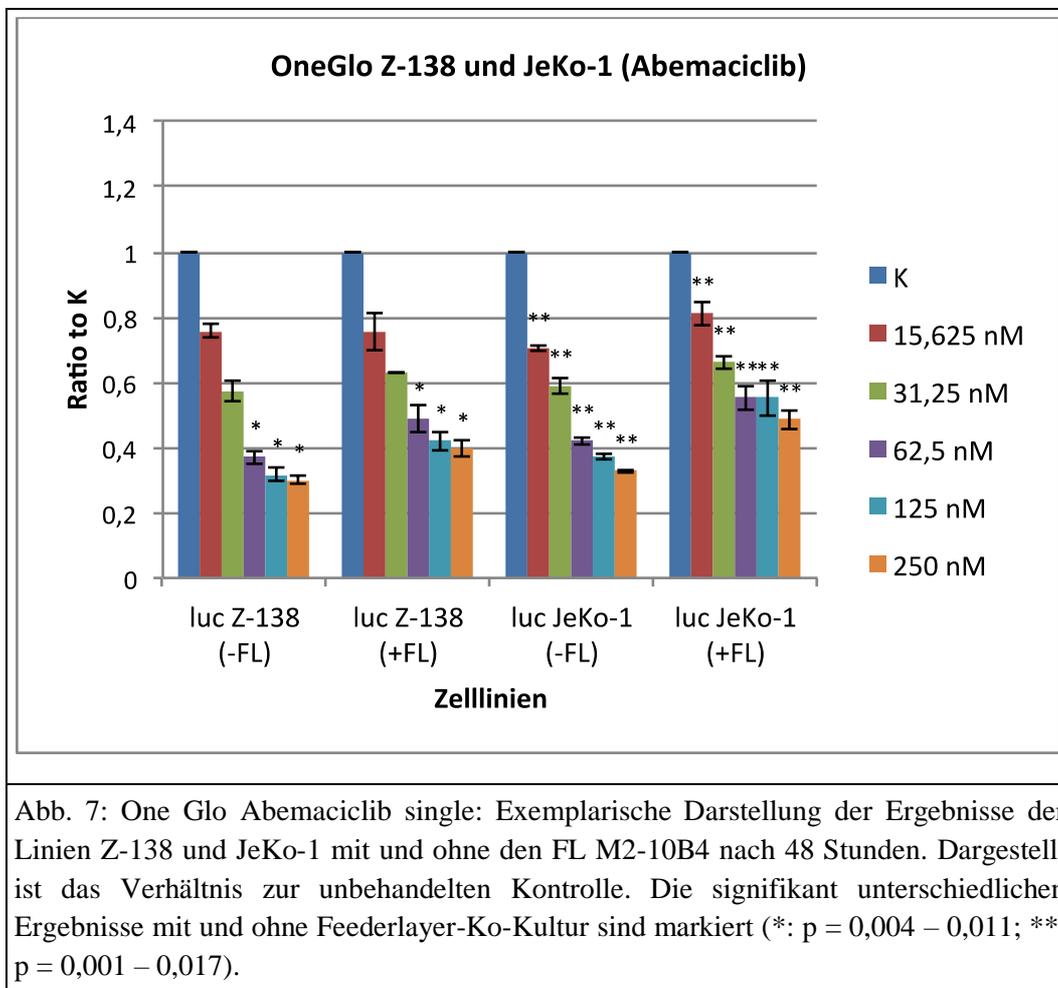
Markiert sind signifikant unterschiedliche Verhältnisse zur Kontrolle zwischen MCL-Reinkultur und eingenisteten Zellen (*) und zwischen Überstand und eingenisteten Zellen (**).

Die Analyse der Zellviabilität gemessen am Vi-Cell zeigte in keiner Zelllinie große Unterschiede zur Kontrolle. Sowohl die behandelten wie auch die unbehandelten Zellen wiesen in allen Kompartimenten Viabilitätswerte zwischen 90 und 100 % auf. Eine Korrelation dieser geringen Abnahme der viablen Zellen zur Analyse der Apoptose wird unter 4.1.1.3. dargestellt.

4.1.1.2. One-Glo Luciferase Assay

Die Untersuchung von Abemaciclib als einzelner Inhibitor wurde mit den zur Verfügung stehenden luciferierten Zelllinien Maver-1, Z-138, JeKo-1 und Granta 519 nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation durchgeführt. Die deutlichsten Ergebnisse zeigten sich in allen Zelllinien nach 48 Stunden, weswegen auch alle weiteren One-Glo Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt durchgeführt wurden. Abemaciclib wurde in einer Verdünnungsreihe von 15,625 nM bis 250 nM verwendet.

In den Zelllinien Maver-1, Z-138 und JeKo-1 konnte eine konzentrationsabhängige Wirkung des Inhibitors zu allen Zeitpunkten sowohl in der Reinkultur als auch in der Ko-Kultur mit dem Feederlayer M2-10B4 gezeigt werden. Dabei war die Wirkung von Abemaciclib in den MCL-Zellen in Ko-Kultur weniger ausgeprägt als in den Zellen in Reinkultur. Auch diese Beobachtung zeigte sich bei allen drei Zelllinien zu allen Zeitpunkten bei fast allen Konzentrationen. In der Linie Granta 519 trat erst bei den höheren Konzentrationen eine Wirkung des Inhibitors ein und der Unterschied zwischen den Zellen mit und ohne FL-Ko-Kultur war deutlich weniger ausgeprägt als in den anderen MCL-Linien. Bei der statistischen Auswertung konnte bei den Zelllinien Maver-1 und Granta 519 kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen mit und ohne Feederlayer ermittelt werden. Für die Linie Z-138 trat in den beiden niedrigeren Konzentrationen ebenfalls keine Signifikanz auf, die beiden höheren Konzentrationen zeigten jedoch wie auch im Diagramm zu erkennen (violette, blaue und orange Säule) einen signifikanten Unterschied ($p = 0,004 - 0,011$) zwischen der Reinkultur und den MCL-Zellen in der FL-Ko-Kultur. In der Zelllinie JeKo-1 konnte für alle verwendeten Konzentrationen ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Fraktionen ermittelt werden ($p = 0,001 - 0,017$). Auch in dieser Analyse zeigte sich somit ein geringeres Ansprechen der Zellen in der FL-Ko-Kultur im Vergleich zu den Zellen der Reinkultur.



4.1.1.3. Apoptose-FACS

Da in den Zellzahlanalysen die MCL-Zelllinien Z-138 und JeKo-1 das stärkste Ansprechen auf die Behandlung mit Abemaciclib gezeigt hatten, wurde die durchflusszytometrische Analyse der Apoptose bei diesen beiden nach 48 Stunden Behandlung durchgeführt. Die Veränderung in der Apoptoserate wurde über die Differenz der 7AAD-positiven, also apoptotischen, Zellen zur unbehandelten Kontrolle untersucht.

Dabei zeigte sich bei den Feederlayerzellen keine Veränderung der 7AAD-positiven Zellen. Bei den MCL-Zellen in den verschiedenen Kompartimenten konnte überall eine nur gering ausgeprägte Steigerung der Apoptoserate nachgewiesen werden. Die Zellen ohne Feederlayer zeigten eine Steigerung von 2,2 bis 4,1 Prozentpunkten (Z-138 2,2%; JeKo-1 4,1%), die Zellen im Überstand von 3,1 bis 14,7 Prozentpunkten (Z-138 3,1%; JeKo-1 14,7%) und die eingesteten MCL-Zellen von 2,0 bis 2,3 Prozentpunkten (Z-138 2,0%; JeKo-1 2,3%).

Trotz des sehr geringen Anstieges konnten tendenziell gleiche Unterschiede in den Kompartimenten wie beim Proliferationsversuch beobachtet werden. Die geringste Apoptoserate zeigte sich in den eingenisteten Zellen. Bei den Zellen in Reinkultur und im Überstand war sie geringfügig höher.

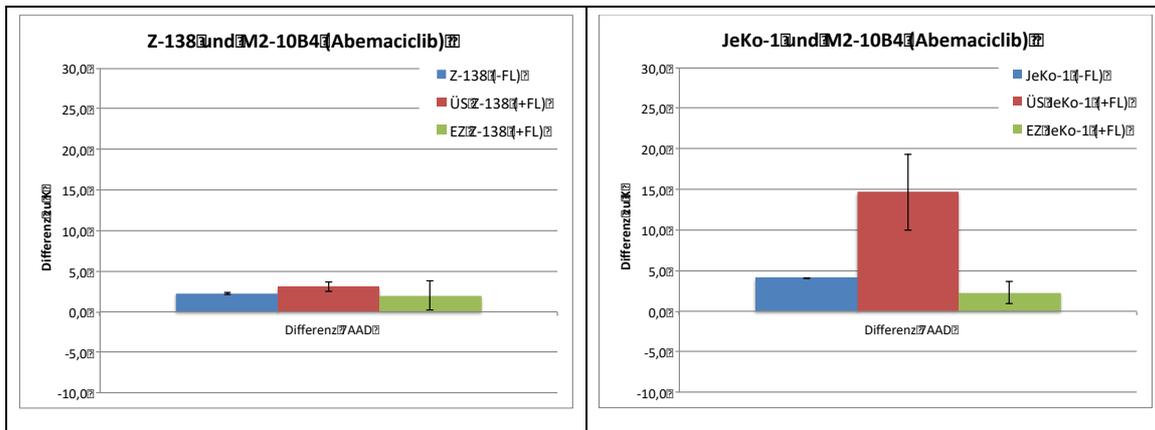
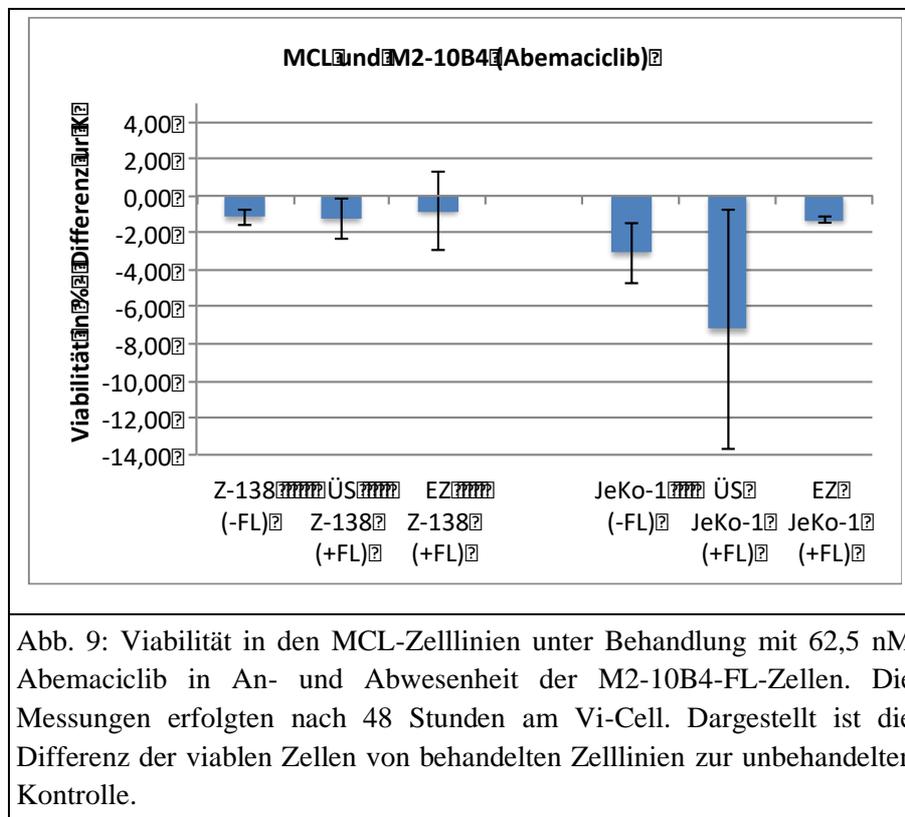


Abb. 8: Apoptose in den MCL-Zelllinien unter Behandlung mit 62,5 nM Abemaciclib in An- und Abwesenheit der M2-10B4-FL-Zellen. Die Messungen erfolgten nach 48 Stunden am FACS-Calibur. Dargestellt ist die Differenz der 7AAD-positiven Zellen von behandelten Zelllinien zur unbehandelten Kontrolle.

Wenn man die Ergebnisse aus der durchflusszytometrischen Analyse der Apoptoserate mit der Messung der Viabilität am Vi-Cell vergleicht, so zeigte sich eine gewisse Korrelation. Die Abnahme der Viabilität ging in allen drei Kompartimenten in die gleiche Richtung wie die Zunahme der 7AAD-positiven Zellen und ließ sich in einer ähnlichen Größenordnung beobachten, der Vergleich der Differenzen zeigte keine Signifikanz. So zeigt sich in der Zelllinie JeKo-1 in der Reinkultur eine Zunahme der apoptotischen Zellen um 4,1 Prozentpunkte und in der Viabilität eine Abnahme um 3,1 Prozentpunkte ($p=0,364$), im Überstand von 14,7 beziehungsweise 7,2 Prozentpunkten ($p=0,182$) und in den eingenisteten Zellen von 2,3 respektive 1,3 Prozentpunkten ($p=0,344$). In den Zellen der Z-138 ergab sich lediglich in den Zellen der Reinkultur ein gerade so signifikanter Unterschied zwischen der Zunahme der Apoptose und der Abnahme der Viabilität ($p=0,041$). Für die Fraktionen Überstand und eingenistete Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied, was die schon graphisch beobachtete Korrelation unterstützt.



4.1.1.4. MACS und Western Blot

Auch die Analysen der Proteinexpression mittels des Western Blots nach dem Auftrennen der Zellfraktionen durch das MACS-Verfahren wurden für die MCL-Zelllinien Z-138 und JeKo-1 durchgeführt. Nach 24 Stunden Behandlung mit 62,5 nM Abemaciclib wurden beide Zelllinien untersucht. Zusätzlich wurde die Linie Z-138 nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden analysiert.

Neben der subjektiven graphischen Analyse der abgebildeten Blots wurde wie unter 3.2.5.3. erläutert eine quantitative Auswertung des Proteinsignals sowie ein Ladekontrollen-korrigiertes Verhältnis zur Kontrolle berechnet.

Um die Wirkung des Inhibitors auf die Signalwege der Zellzykluskontrolle zu zeigen wurden verschiedene Proteine aus diesem Bereich analysiert. So wurde das direkte Zielprotein des Inhibitors CDK 4 sowie die weiter downstream im Signalpfad gelegenen Proteine Rb, pRb, CDK 2 und cMyc untersucht. Um mögliche Mechanismen der Beeinflussung durch das Microenvironment genauer darzustellen wurden als zentrale Proteine des B-Zell-Rezeptor- und PI3K-Signalweges AKT, p-AKT und die p44/42 MAP-Kinase sowie Raptor und p-Raptor als Teil des mTOR-Komplexes analysiert.

4.1.1.4.1. Proteine der Zellzyklusregulation

CDK 4 wird von Abemaciclib gehemmt, die Proteinexpression an sich jedoch nicht beeinflusst. Man würde also keine großen Änderungen der Proteinmengen erwarten. Dies bestätigte sich auch in der Auswertung der Western Blots. Weder in den MCL-Zellen in Reinkultur noch in den Zellen aus dem Überstand oder den eingenisteten Zellen konnten große Änderungen der CDK 4 Expression beobachtet werden. Nur bei der Analyse der Z-138 nach 4 Stunden wurde eine gering ausgeprägte Erhöhung der CDK 4 Proteinlevel detektiert (112% – 143% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle).

Am Retinoblastoma-Protein (Rb), welches durch den Komplex aus CDK 4/6 und Cyclin D phosphoryliert wird, lässt sich die Wirkung des CDK4/6-Inhibitors Abemaciclib direkt darstellen. So konnte in allen Kompartimenten eine deutliche Hemmung der aktivierten Form ph-Rb, aber auch der Expression von Rb an sich gezeigt werden. In den Zellen in Reinkultur zeigte sich ein Verhältnis von ph-Rb zur unbehandelten Kontrolle von 0% bis 5% nach 24 Stunden, die Hemmung nach 4 Stunden war mit einem Verhältnis von 47% noch weniger stark ausgeprägt. Bei den Zellen im Überstand wurde eine Abnahme auf 4% bis 59% gemessen, nach 4 Stunden zeigte sich ein Verhältnis von 54%. Auch in den eingenisteten Zellen konnte diese Wirkung gezeigt werden, die Proteinexpression von ph-Rb betrug 0% bis 1% nach 24 Stunden.

Antikörper	JeKo-1 (-FL)	ÜS JeKo-1 (+FL)	EZ JeKo-1 (+FL)	Z-138 (-FL)	ÜS Z-138 (+FL)	EZ Z-138 (+FL)
ph-Rb	 0%	 4%	 0%	 5%	 59%	 1%
Rb	 35%	 55%	 46%	 8%	 74%	 24%
GAPDH						

Abb. 10: Western Blot ph-Rb und Rb unter Abemaciclib: Die Expression durch JeKo-1 und Z-138 jeweils mit und ohne FL-Ko-Kultur unter 62,5 nM Abemaciclib wurde nach 24 Stunden analysiert.

Die unbehandelte Kontrolle befindet sich jeweils links, darunter ist das ladekontrollenkorrigierte Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle aufgeführt.

In der Zeile darunter ist die Ladekontrolle GAPDH abgebildet.

CDK 2, als am Beginn der Synthesephase gelegene und nicht direkt von CDK4/6 beeinflusste Kinase, zeigte in den beiden untersuchten Zelllinien ein unterschiedliches Ansprechen auf den Inhibitor. In den Zellen in Reinkultur konnte sowohl in der JeKo-1 als auch in der Z-138 eine verminderte Expression von CDK 2 von 84% respektive 86% im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle gemessen werden. Die Zellen der JeKo-1 zeigten in den Fraktionen des Überstandes und der eingenisteten Zellen nur ein geringes Ansprechen von 88% und 97% im Verhältnis zur Kontrolle. In der Linie Z-138 hingegen zeigte sich im Überstand ein Verhältnis von 36% und in den eingenisteten Zellen ein Verhältnis von 63% zur unbehandelten Kontrolle und somit eine deutlich verminderte Expression von CDK 2 in diesen Kompartimenten.

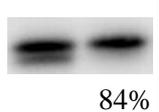
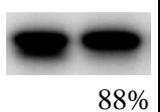
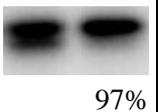
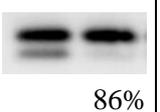
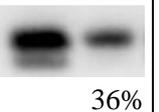
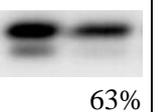
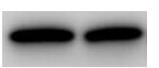
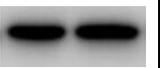
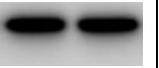
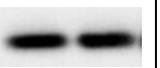
Antikörper	JeKo-1 (-FL)	ÜS JeKo-1 (+FL)	EZ JeKo-1 (+FL)	Z-138 (-FL)	ÜS Z-138 (+FL)	EZ Z-138 (+FL)
CDK 2	 84%	 88%	 97%	 86%	 36%	 63%
GAPDH						

Abb. 11: Western Blot CDK 2 unter Abemaciclib: Die Expression durch JeKo-1 und Z-138 jeweils mit und ohne FL-Ko-Kultur unter 62,5 nM Abemaciclib wurde nach 24 Stunden analysiert.

Die unbehandelte Kontrolle befindet sich jeweils links, darunter ist das ladekontrollenkorrigierte Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle aufgeführt.

In der Zeile darunter ist die Ladekontrolle GAPDH abgebildet.

cMyc zeigt als von E2F kontrolliertes Protein vor allem in den MCL-Zellen, welche in Ko-Kultur zum FL gewachsen sind, eine geringere Expression unter Abemaciclib.

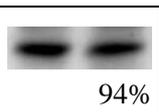
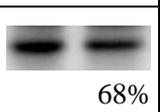
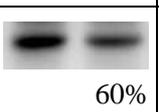
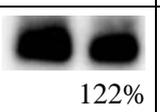
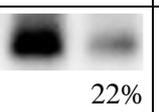
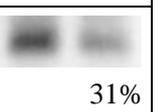
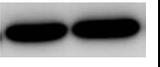
Antikörper	JeKo-1 (-FL)	ÜS JeKo-1 (+FL)	EZ JeKo-1 (+FL)	Z-138 (-FL)	ÜS Z-138 (+FL)	EZ Z-138 (+FL)
cMyc	 94%	 68%	 60%	 122%	 22%	 31%
GAPDH						

Abb. 12: Western Blot cMyc unter Abemaciclib: Die Expression durch JeKo-1 und Z-138 jeweils mit und ohne FL-Ko-Kultur unter 62,5 nM Abemaciclib wurde nach 24 Stunden analysiert.

Die unbehandelte Kontrolle befindet sich jeweils links, darunter ist das ladekontrollenkorrigierte Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle aufgeführt.

In der Zeile darunter ist die Ladekontrolle GAPDH abgebildet.

4.1.1.4.2. B-Zell-Rezeptor-Signalweg

Während nach 4 Stunden für die aktivierten Formen von AKT, ph-AKT(Thr) und ph-AKT(Ser) nur ein diskreter Rückgang in den behandelten Zellen und keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kompartimenten zu sehen waren, zeigte die Analyse nach 24 Stunden deutlichere Ergebnisse. Beide phosphorylierte Formen waren in den behandelten Zellen in Reinkultur deutlich weniger exprimiert als in den Zellen in Ko-Kultur mit dem Feederlayer. Bei der Z-138 zeigte sich ein massiver Rückgang der Expression in den Zellen in Reinkultur auf 16% (ph-AKT Thr³⁰⁸) beziehungsweise 3% (ph-AKT Ser⁴⁷³) während sich in den Zellen mit Ko-Kultur weniger Veränderung bis hin zu einer starken Steigerung nachweisen ließ.

Antikörper	JeKo-1 (-FL)	ÜS JeKo-1 (+FL)	EZ JeKo-1 (+FL)	Z-138 (-FL)	ÜS Z-138 (+FL)	EZ Z-138 (+FL)
ph-AKT (Thr ³⁰⁸)	96%	255%	127%	16%	64%	82%
ph-AKT (Ser ⁴⁷³)	86%	173%	120%	3%	120%	487%
AKT	121%	121%	118%	70%	66%	105%
ph-Raptor	92%	118%	89%	68%	74%	116%
Raptor	99%	113%	91%	354%	49%	56%
GAPDH						

Abb. 13: Western Blot ph-AKT und AKT sowie ph-Raptor und Raptor unter Abemaciclib: Die Expression durch JeKo-1 mit und ohne FL-Ko-Kultur unter 62,5 nM Abemaciclib wurde nach 24 Stunden, die Expression durch Z-138 nach 24 beziehungsweise 4 Stunden (Raptor) analysiert.

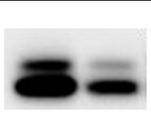
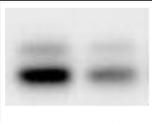
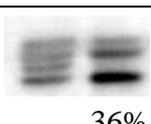
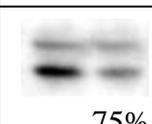
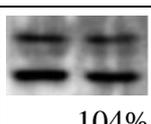
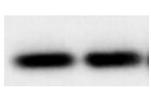
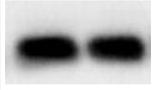
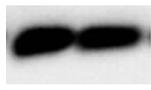
Die unbehandelte Kontrolle befindet sich jeweils links, darunter ist das ladekontrollenkorrigierte Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle aufgeführt.

In der Zeile darunter ist die Ladekontrolle GAPDH abgebildet.

Bei den Zellen der JeKo-1 zeigte sich in Reinkultur kaum eine Veränderung, in den ko-kultivierten Zellen hingegen eine Überexpression unter Abemaciclib-Therapie auf bis zu 255% der Expression der unbehandelten Kontrolle.

Bei der Aktivierung von Raptor hingegen konnte der Unterschied zwischen den Kompartimenten bereits nach 4 Stunden gezeigt werden. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich in den Zellen der Z-138 in Reinkultur eine Abnahme der aktivierten Form ph-Raptor auf 68%, während diese Abnahme in den Zellen im Überstand mit 74% etwas weniger ausgeprägt war und bei den eingenisteten Zellen sogar eine geringe Zunahme der Aktivierung auf 116% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet werden konnte. Nach 24 Stunden konnte in der Raptor-Proteinexpression kein signifikanter Unterschied zwischen den Fraktionen beobachtet werden.

Als weiterer Teil des dichten Signalnetzwerks downstream des B-Zell-Rezeptors und der PI3K zeigte die Untersuchung der p44/42-MAPK und ihrer phosphorylierten Form einen deutlichen Unterschied zwischen den eingenisteten Zellen der Z-138 und den Zellen in Reinkultur oder dem Überstand der Ko-Kultur. Während sich sowohl für die aktive Form als auch die Grundform der p44/42-MAPK in der Reinkultur und im Überstand eine deutliche Verminderung der Expression unter der Abemaciclib-Therapie zeigte, ließ sich in den eingenisteten MCL-Zellen keine signifikante Abnahme der Expression beider Formen beobachten.

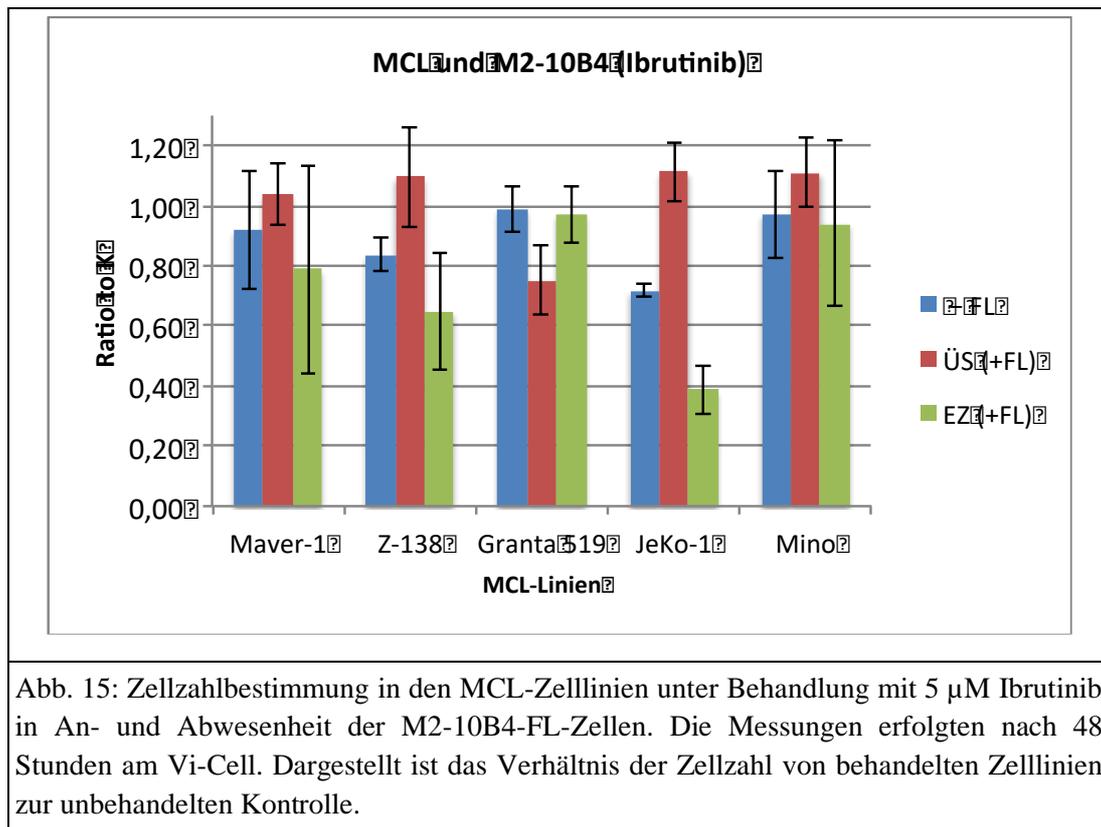
Antikörper	Z-138 (-FL)	ÜS Z-138 (+FL)	EZ Z-138 (+FL)	Abb. 14: Western Blot ph-p44/42-MAPK und p44/42-MAPK unter Abemaciclib: Die Expression durch Z-138 wurde nach 24 Stunden analysiert. Die unbehandelte Kontrolle befindet sich jeweils links, darunter ist das ladekontrollenkorrigierte Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle aufgeführt. In der Zeile darunter ist die Ladekontrolle GAPDH abgebildet.
ph-p44/42 MAPK	 20% 33%	 22% 37%	 88% 100%	
p44/42 MAPK	 36% 49%	 75% 42%	 104% 113%	
GAPDH				

4.1.2. Ibrutinib

4.1.2.1. Vi-Cell Zählversuche

Die Proliferationsversuche wurden mit allen Zelllinien und dem Feederlayer M2-10B4 durchgeführt und nach 24, 48 und 72 Stunden ausgewertet. Ibrutinib wurde in der Konzentration 5 μ M verwendet.

Die Linien Maver-1 und JeKo-1 zeigten bereits nach 24 Stunden ein Ansprechen auf den Inhibitor während nach 72 Stunden die Hemmung bereits wieder rückläufig war. Bei den Linien Z-138 und Granta 519 konnte hingegen erst nach 48 Stunden eine Wirkung beobachtet werden. Übergreifend über alle Zelllinien zeigten die Messungen nach 48 Stunden die deutlichsten Ergebnisse. Insgesamt betrachtet zeigten alle Zellen nur eine geringe Ansprechrate auf Ibrutinib in dieser Konzentration.

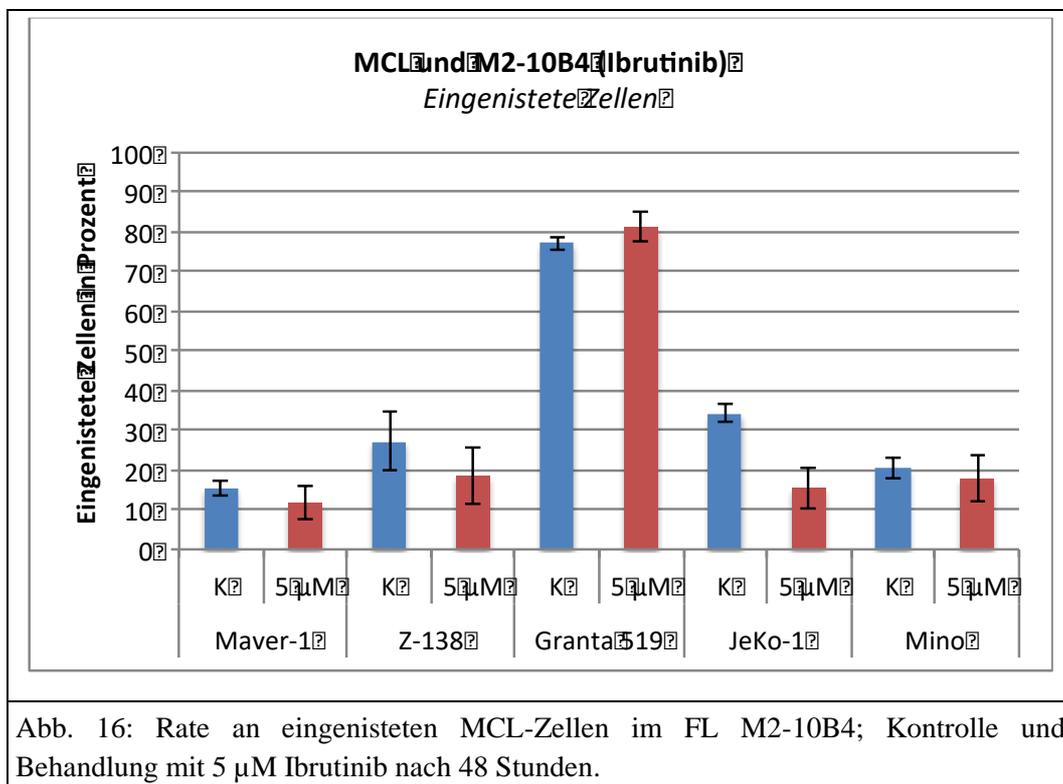


Es traten allerdings deutliche Unterschiede in den einzelnen Kompartimenten auf. Während die Zellzahl in den MCL-Linien in Reinkultur meist eine eher mäßig ausgeprägte Reduktion von bis zu 28% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aufwies, zeigte sich bei den Zellen in Ko-Kultur ein heterogenes Bild. Die Zellzahl im Überstand wurde bei den Linien Maver-1, Z-138 und JeKo-1 nicht vermindert, teilweise stieg sie sogar an. Bei den eingenisteten Zellen dieser drei Linien zeigte sich hingegen

eine stärkere Verminderung der Zellzahl (bis zu 61%) als in den Zellen ohne Feederlayer. Die Zelllinie Mino zeigte bei nur geringer Inhibition der Proliferation durch Ibrutinib ebenfalls dieses Muster. Die Granta 519 wies bei ebenfalls nur geringer Wirkung ein umgekehrtes Verhältnis auf, die Zellen im Überstand sprachen stärker auf die Behandlung mit Ibrutinib an als die eingenisteten Zellen.

Im Gegensatz zu den Proliferationswerten zeigte die am Vi-Cell gemessene Viabilität der Zellen keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle.

Die stärkere Wirkung von Ibrutinib auf die eingenisteten Zellen warf die Frage auf, ob Ibrutinib diese Einnistung der MCL-Zellen in den Feederlayer behindert. Um dies genauer darzustellen wurden die Anteile der Lymphomzellen in Ko-Kultur berechnet, die sich in den FL eingenistet haben. Tatsächlich zeigt sich bei allen Zelllinien außer der Granta 519 eine Abnahme der eingenisteten Zellen, bei der JeKo-1 sogar um über 50%. Die Granta 519 wiederum weist von allen Zellen bei weitem die höchste Einnistungsrate mit und ohne Inhibitor von bis zu 81% auf. Dies erklärt zumindest teilweise das Wirkungsmuster, die Einnistung der MCL-Zellen wurde durch Ibrutinib behindert und die Zellen somit in den Überstand ausgeschwemmt.



4.1.2.2. One-Glo Luciferase Assay

Auch Ibrutinib wurde als Single-Inhibitor in allen vier luciferierten Zelllinien nach 48 Stunden Inkubation mit und ohne Feederlayer-Ko-Kultur untersucht. Es konnte in allen Lymphomzellen eine Wirkung des Inhibitors beobachtet werden, am stärksten war diese in der Linie JeKo-1 ausgeprägt. Aber auch die Granta 519, welche in der Zellzählung sehr wenig Reaktion gezeigt hatte, sprach auf die Ibrutinib-Behandlung in der One Glo Analyse an. Bei allen MCL-Linien zeigte sich eine stärkere Wirkung in den Zellen ohne FL-Ko-Kultur. Das Ansprechen stieg in allen Ansätzen mit der Konzentration des Inhibitors im Bereich von 0,31 μM bis 5 μM an. Im One Glo Assay erfolgt keine Trennung der Lymphomzellen aus der Ko-Kultur in Überstand und eingenistete Zellen, weshalb der zuvor beobachtete Unterschied zwischen diesen beiden Fraktionen hier nicht weiter aufgeschlüsselt wurde. Deshalb kann auch die stärkere Wirkung von Ibrutinib in den eingenisteten Zellen im One-Glo nicht dargestellt werden.

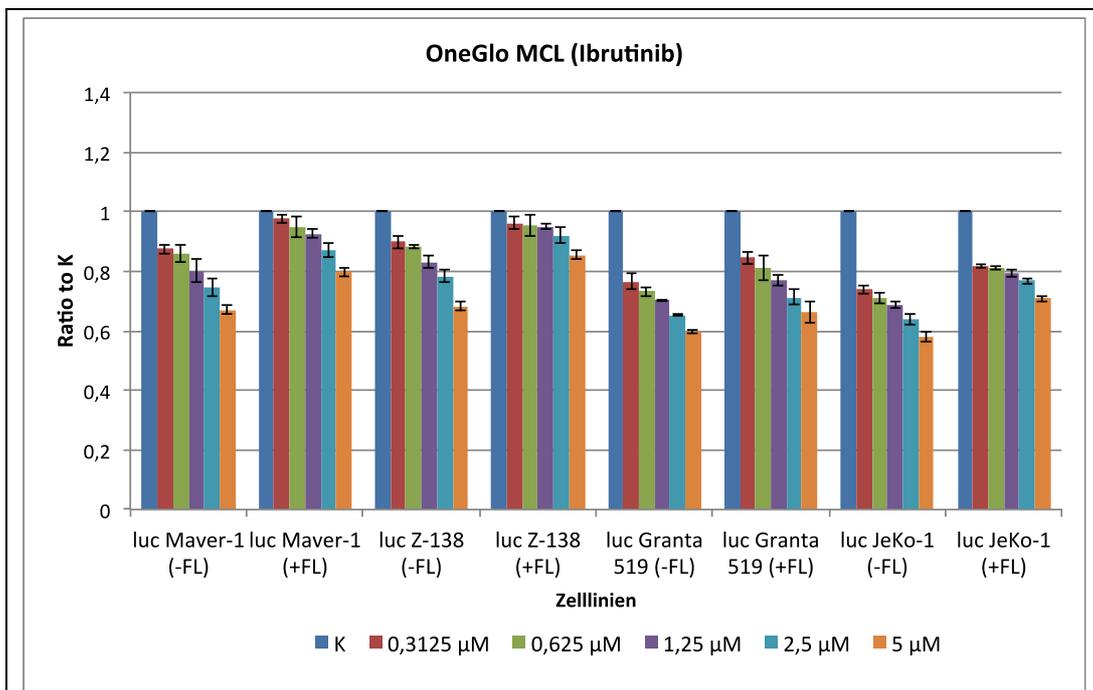
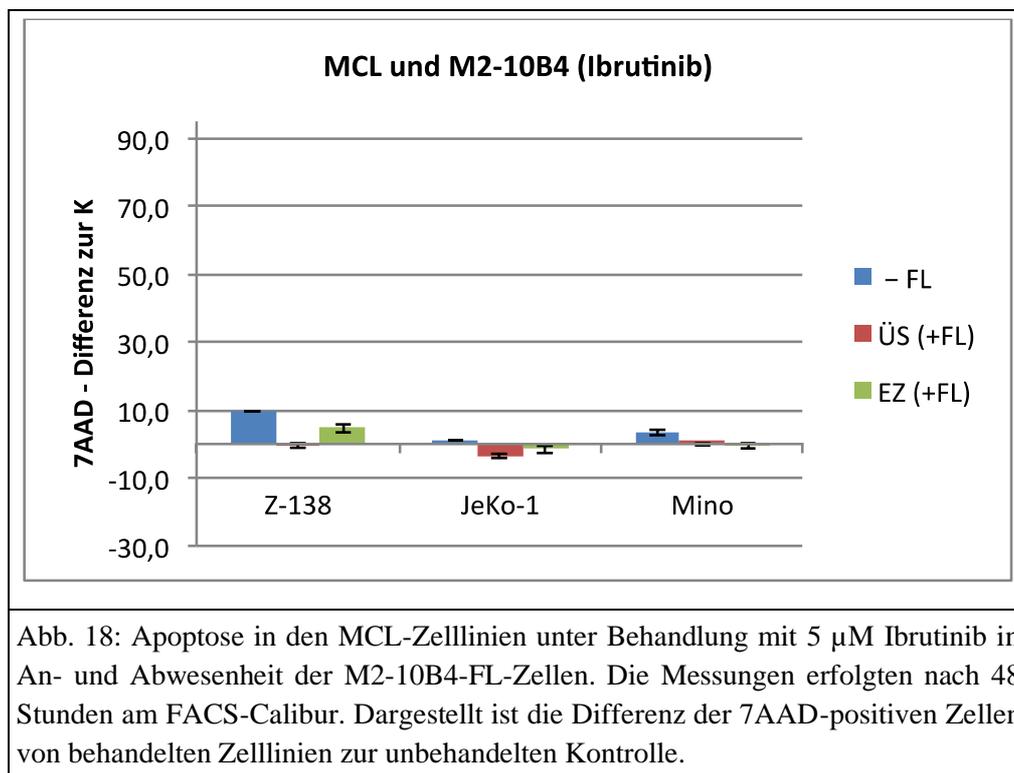


Abb. 17: One-Glo Ibrutinib single: alle MCL-Zelllinien wurden mit und ohne M2-10B4 als Feederlayer nach 48 Stunden Ibrutinib-Behandlung analysiert. Dargestellt ist das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle für die verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

4.1.2.3. Apoptose-FACS

Wie bei der Untersuchung von Abemaciclib wurden auch hier die Zelllinien Z-138 und JeKo-1 sowie zusätzlich die Mino mittels durchflusszytometrischer 7AAD-Analyse auf ihre Apoptoserate untersucht.

Der Feederlayer M2-10B4 zeigte in allen Ansätzen keine signifikante Änderung der Apoptoserate. Auch in den untersuchten Lymphomzellen konnten kaum Änderungen festgestellt werden. In der MCL-Reinkultur zeigte die Linie Z-138 einen Anstieg der 7AAD-positiven Zellen um 9 Prozentpunkte, die Mino um 3 Prozentpunkte und die JeKo-1 gar nur um 1 Prozentpunkt. In den Lymphomzellen in FL-Ko-Kultur konnte ebenfalls keine Änderung der Apoptoserate beobachtet werden und auch die eingesteten Zellen zeigten lediglich in der Linie Z-138 eine geringfügige Änderung um 5 Prozentpunkte.



4.1.2.4. MACS und Western Blot

Die Untersuchungen der Proteinexpression mittels Western Blot nach Auftrennung von Lymphom- und Feederlayerzellen mittels MACS wurde für die Zelllinien Z-138 und JeKo-1 nach 4 Stunden sowie für die Z-138 zusätzlich nach 24 Stunden Behandlung mit

5 μ M Ibrutinib durchgeführt. Zunächst wurde die Brutons Tyrosin Kinase als direktes Zielprotein des Inhibitors sowie die unmittelbar in Kontakt stehenden Kinasen SYK und PLC γ untersucht. Des Weiteren wurden MEK 1/2, die p44/42 MAPK sowie NF κ B₂ als nachgeordnete Elemente des Signalpfades dargestellt. Wie schon unter der Therapie mit Abemaciclib wurde auch hier die Aktivität von AKT gemessen. Außerdem wurde die Expression der proapoptotischen Proteine Caspase 3, Caspase 8 und PARP untersucht.

4.1.2.4.1. BTK, SYK und PLC γ

Die Analyse der Proteine BTK und SYK, ihrer phosphorylierten Formen sowie von PLC γ zeigte nach 4 Stunden die deutlichsten Ergebnisse. Ph-BTK als aktivierte Form von BTK wurde durch die Behandlung mit Ibrutinib in beiden Zelllinien sowohl in den Lymphomzellen in Reinkultur als auch in den Zellen im Überstand und in den eingesteten Zellen in der FL-Ko-Kultur suffizient inhibiert. BTK selbst wurde vor allem in den eingesteten Zellen sowie im Überstand der JeKo-1 weniger exprimiert. Die am B-Zell-Rezeptor benachbarte Kinase SYK zeigte ebenfalls in den eingesteten Zellen sowie in der JeKo-1 in Reinkultur deutlich weniger Aktivität als in der unbehandelten Kontrolle. Die Expression von nicht aktiviertem SYK wurde nur in den eingesteten Zellen der Z-138 vermindert. Die weiter downstream gelegene Kinase PLC γ zeigte nur in den eingesteten Zellen ein Ansprechen auf die Behandlung mit Ibrutinib nach 4 Stunden, wobei sich dieses Ergebnis auch nach 24 Stunden identisch beobachten ließ.

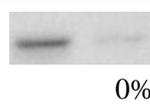
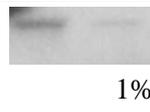
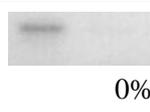
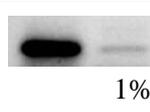
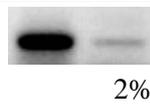
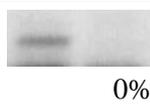
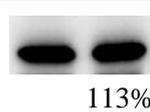
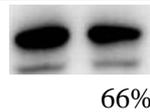
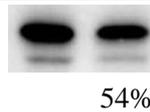
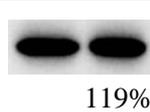
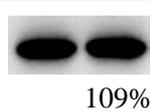
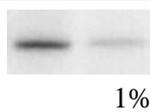
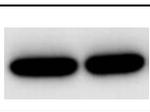
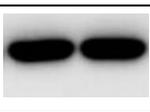
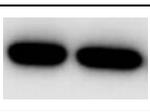
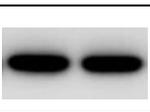
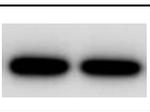
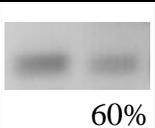
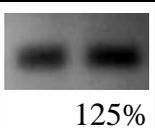
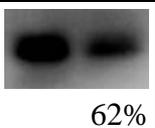
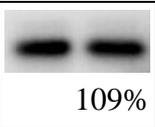
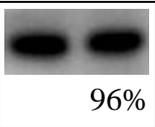
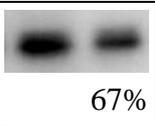
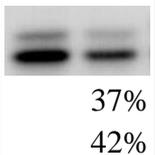
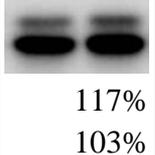
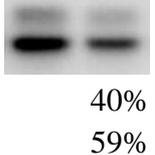
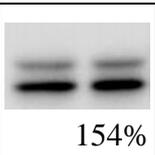
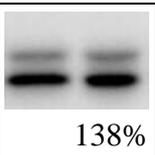
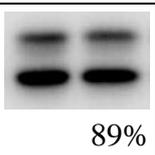
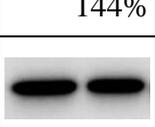
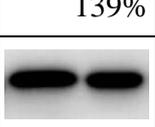
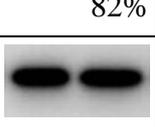
Antikörper	JeKo-1 (-FL)	ÜS JeKo-1 (+FL)	EZ JeKo-1 (+FL)	Z-138 (-FL)	ÜS Z-138 (+FL)	EZ Z-138 (+FL)
ph-BTK (Tyr ²²³)	 0%	 1%	 0%	 1%	 2%	 0%
BTK	 113%	 66%	 54%	 119%	 109%	 1%
GAPDH						

Abb. 19: Western Blot ph-BTK und BTK unter Ibrutinib: Die Expression durch JeKo-1 und Z-138 jeweils mit und ohne FL-Ko-Kultur unter 5 μ M Ibrutinib wurde nach 4 Stunden analysiert. Die unbehandelte Kontrolle befindet sich jeweils links, darunter ist das ladekontrollenkorrigierte Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle aufgeführt. In der Zeile darunter ist die Ladekontrolle GAPDH abgebildet.

4.1.2.4.2. MEK, MAPK, NFκB und Akt

Die im Signalweg nachgeordneten Kinasen MEK 1/2 und p44/42 MAPK zeigten ein heterogenes Bild. Ph-MEK 1/2 wie auch MEK 1/2 wurde in der Z-138 nach 4 Stunden bei den eingenisteten Zellen weniger exprimiert, ph-MEK 1/2 auch bei den Zellen ohne Feederlayer, in den übrigen Fraktionen zeigte sich keine Änderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle. In den JeKo-1 Zellen konnte ph-MEK 1/2 nicht dargestellt werden, in der Expression von MEK 1/2 ergaben sich keine Veränderungen. Die aktive ph-p44/42 MAPK zeigte in der Z-138 eine verminderte Expression in den eingenisteten Zellen und den Zellen ohne Ko-Kultur, im Überstand blieb die Expression in etwa identisch zur Kontrolle. Die nicht phosphorylierte Form p44/42 MAPK wurde in den eingenisteten Zellen dieser Linie nur etwas vermindert exprimiert, in den anderen beiden Fraktionen zeigte sich eine gesteigerte Expression. Bei den Zellen der Linie JeKo-1 konnte die aktivierte Form nur bedingt nachgewiesen werden, hierbei zeigten sich keine signifikanten Änderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch das Expressionslevel der p44/42 MAPK blieb in der JeKo-1 unter Therapie stabil.

Antikörper	Z-138 (-FL)	ÜS Z-138 (+FL)	EZ Z-138 (+FL)	
ph-MEK 1/2	 60%	 125%	 62%	Abb. 20: Western Blot ph-MEK 1/2 und MEK 1/2 sowie ph-p44/42 MAPK und p44/42 MAPK unter Ibrutinib: Die Expression durch Z-138 unter 5 µM Ibrutinib wurde nach 4 Stunden analysiert Die unbehandelte Kontrolle befindet sich jeweils links, darunter ist das ladekontrollenkorrigierte Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle aufgeführt. In der Zeile darunter ist die Ladekontrolle GAPDH abgebildet.
MEK 1/2	 109%	 96%	 67%	
ph-p44/42 MAPK	 37% 42%	 117% 103%	 40% 59%	
p44/42 MAPK	 154% 144%	 138% 139%	 89% 82%	
GAPDH				

Die Expression von NFκB₂ zeigte vor allem bei den eingenisteten Zellen einen Effekt auf die Therapie mit Ibrutinib. Sowohl in der JeKo-1 als auch der Z-138 kam es zu einer

deutlichen Verminderung der aktiven Form p52 NFκB₂. Die ruhende Form p100 NFκB₂ zeigte nur in der JeKo-1 eine Verminderung. Bei den Zellen im Überstand der Ko-Kultur kam es bei der Jeko-1 zu einer Inhibition beider Formen, bei der Z-138 blieb die Expression von p100 NFκB₂ stabil, während p52 NFκB₂ anstieg. Ebenso verhielt es sich in den Lymphomzellen beider Linien in Reinkultur.

Antikörper	JeKo-1 (-FL)	ÜS JeKo-1 (+FL)	EZ JeKo-1 (+FL)	Z-138 (-FL)	ÜS Z-138 (+FL)	EZ Z-138 (+FL)
p100 p52 NFκB ₂	214%	44%	16%	23%	147%	42%
GAPDH						

Abb. 21: Western Blot p100 und p52 NFκB₂ unter Ibrutinib: Die Expression durch JeKo-1 und Z-138 jeweils mit und ohne FL-Ko-Kultur unter 5 μM Ibrutinib wurde nach 4 Stunden analysiert.

Die unbehandelte Kontrolle befindet sich jeweils links, darunter ist das ladekontrollenkorrigierte Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle aufgeführt.

In der Zeile darunter ist die Ladekontrolle GAPDH abgebildet.

Antikörper	JeKo-1 (-FL)	ÜS JeKo-1 (+FL)	EZ JeKo-1 (+FL)	Z-138 (-FL)	ÜS Z-138 (+FL)	EZ Z-138 (+FL)
ph-AKT (Thr ³⁰⁸)	92%	89%	170%	45%	67%	45%
ph-AKT (Ser ⁴⁷³)	85%	37%	159%	20%	73%	44%
AKT	103%	103%	105%	97%	128%	102%
GAPDH						

Abb. 22: Western Blot ph-AKT(Thr³⁰⁸ und Ser473) und AKT unter Ibrutinib:

Die Expression durch JeKo-1 und Z-138 jeweils mit und ohne FL-Ko-Kultur unter 5 μM Ibrutinib wurde nach 4 Stunden analysiert.

Die unbehandelte Kontrolle befindet sich jeweils links, darunter ist das ladekontrollenkorrigierte Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle aufgeführt.

In der Zeile darunter ist die Ladekontrolle GAPDH abgebildet.

Der Einfluss von Ibrutinib auf die Expression und Aktivierung von AKT zeigte ebenfalls deutlichere Ergebnisse in der Western Blot Untersuchung nach 4 Stunden. In der Zelllinie Z-138 konnte in allen drei Kompartimenten der Lymphomzellen eine deutliche Hemmung der aktiven Formen ph-AKT (Thr³⁰⁸ und Ser⁴⁷³) beobachtet werden. Die Expression der inaktiven Form AKT blieb dabei in etwa identisch zur unbehandelten Kontrolle. Auch in der JeKo-1 zeigte sich bei AKT keine relevante Veränderung. Die aktiven Formen ph-AKT(Thr³⁰⁸ und Ser⁴⁷³) zeigten im Gegensatz zur Z-138 eine nur geringe Hemmung in der Reinkultur und den Zellen des Überstands und sogar eine vermehrte Expression in den eingesteten Zellen.

4.1.2.4.3. Apoptosemarker

Um eine mögliche Apoptoseinduktion durch die Behandlung mit Ibrutinib auf Ebene der Proteinexpression zu untersuchen wurde in beiden Zelllinien die Expression von Caspase 8, Caspase 3 und PARP sowie der jeweiligen Spaltprodukte, die eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Apoptose spielen [118-120], untersucht.

Antikörper	JeKo-1 (-FL)	ÜS JeKo-1 (+FL)	EZ JeKo-1 (+FL)	Z-138 (-FL)	ÜS Z-138 (+FL)	EZ Z-138 (+FL)
Caspase 8						
Caspase 3						
PARP						
GAPDH						

Abb. 23: Western Blot Caspase 8, Caspase 3 und PARP unter Ibrutinib: Die Expression durch JeKo-1 und Z-138 jeweils mit und ohne FL-Ko-Kultur unter 5 µM Ibrutinib wurde nach 4 Stunden analysiert. Die unbehandelte Kontrolle befindet sich jeweils links, der untere Blot zeigt die Region in der das gespaltene Protein aufgetragen wird. In der Zeile darunter ist die Ladekontrolle GAPDH abgebildet.

Dabei zeigte sich sowohl in der Z-138 als auch der JeKo-1 kein Nachweis von Spaltprodukten in dem Bereich des Blots, indem Proteine der entsprechenden Größe aufgetragen wären.

4.1.3. Cytarabin

4.1.3.1. Vi-Cell Zählversuche

Die Untersuchungen zur Proliferation unter Therapie mit Cytarabin wurden mit den MCL-Zelllinien Z-138, JeKo-1 und Mino sowie dem Feederlayer M2-10B4 durchgeführt. Cytarabin wurde in der Konzentration 3,3 μM verwendet. Die Messungen am Vi-Cell wurden nach 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt.

Alle Lymphomzelllinien zeigten zu allen Zeitpunkten ein deutliches Ansprechen auf die Therapie. Vorwiegend sank das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle im Zeitverlauf weiter ab, nur in der den eingesteten Zellen der Mino schien die Wirkung nach 72 Stunden bereits wieder abgeschwächt zu sein.

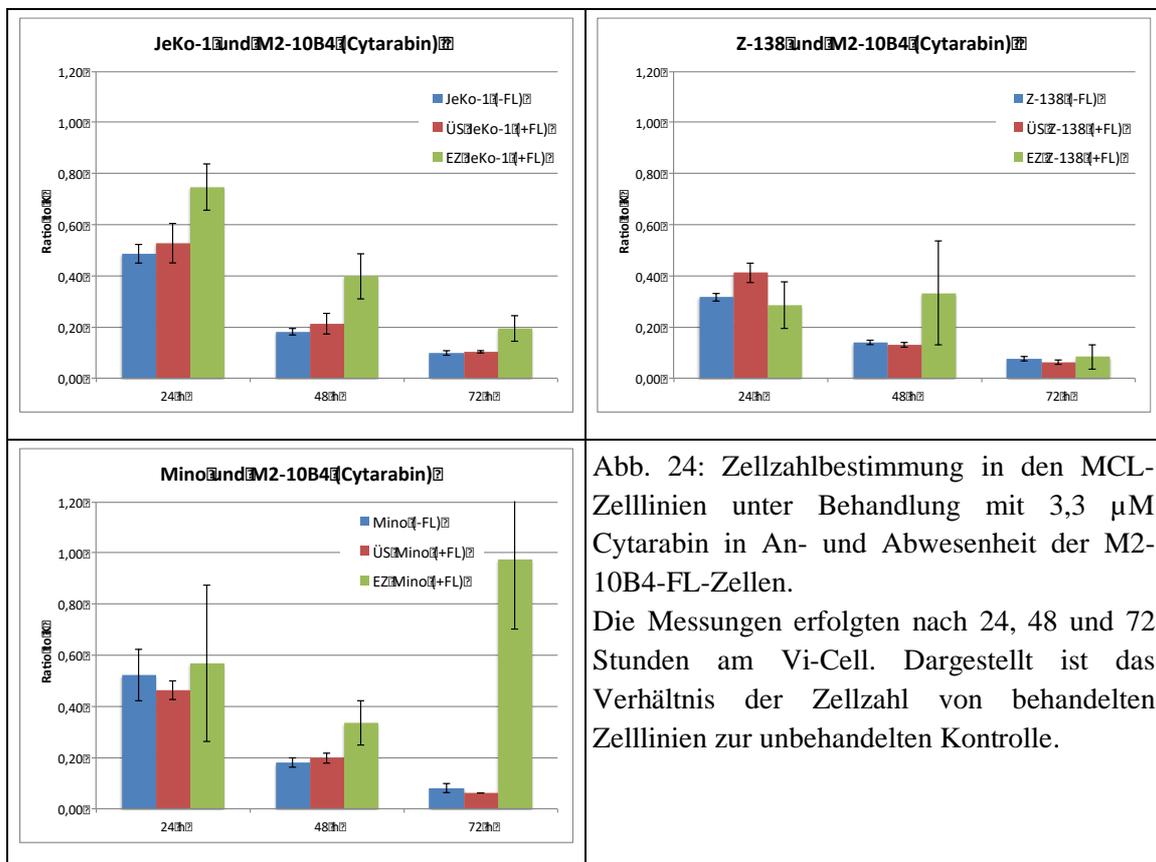


Abb. 24: Zellzahlbestimmung in den MCL-Zelllinien unter Behandlung mit 3,3 μM Cytarabin in An- und Abwesenheit der M2-10B4-FL-Zellen.

Die Messungen erfolgten nach 24, 48 und 72 Stunden am Vi-Cell. Dargestellt ist das Verhältnis der Zellzahl von behandelten Zelllinien zur unbehandelten Kontrolle.

Insgesamt zeigten sich in der Analyse nach 48 Stunden die deutlichsten Ergebnisse. Zu diesem Zeitpunkt waren auch die Unterschiede zwischen den einzelnen Fraktionen

konstant zu beobachten. Die Feederlayerzellen selbst zeigten eine um 30% geringere Zellzahl als die der unbehandelten Kontrolle. Die Lymphomzellen in der Reinkultur zeigten zu diesem Zeitpunkt ein Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle zwischen 0,14 und 0,18 (Z-138 0,14; JeKo-1 0,18; Mino 0,18). Ähnliche Werte konnten bei den Zellen im Überstand beobachtet werden, sie bewegten sich zwischen 0,13 und 0,21 (Z-138 0,13, JeKo-1 0,21, Mino 0,20). Die im Feederlayer eingenisteten Zellen zeigten hingegen ein deutlich geringeres Ansprechen auf die Zytostatikatherapie mit einem Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle im Bereich von 0,33 bis 0,40 (Z-138 0,33; JeKo-1 0,40; Mino 0,34).

Die Auswertung der Viabilitätsmessung am Vi-Cell zeigte ein identisches Muster. Auch hier sank die Viabilität am stärksten in den Zellen in Reinkultur sowie den Zellen des Überstandes ab, während die eingenisteten Zellen eine weniger ausgeprägte Abnahme zeigten. Die Zellen des Feederlayers M2-10B4 zeigten dabei kaum eine Änderung der Viabilität, deshalb sind die Messungen der Viabilität der eingenisteten Zellen überhaupt erst analysierbar, da am Vi-Cell keine Trennung dieser Fraktionen bei der Viabilitätsmessung erfolgen kann.

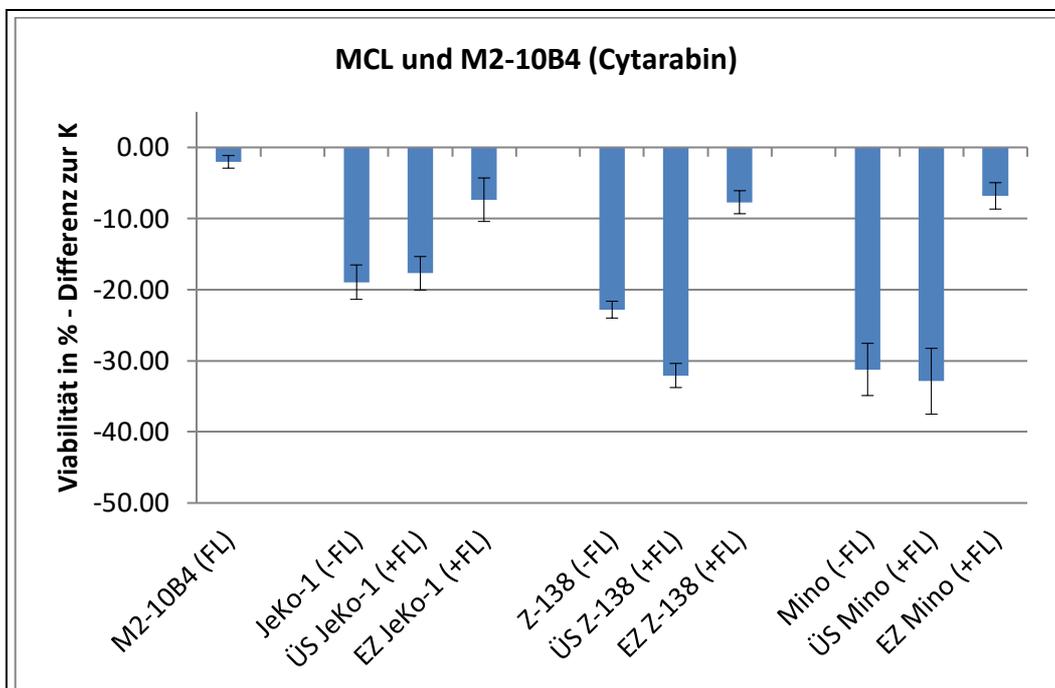
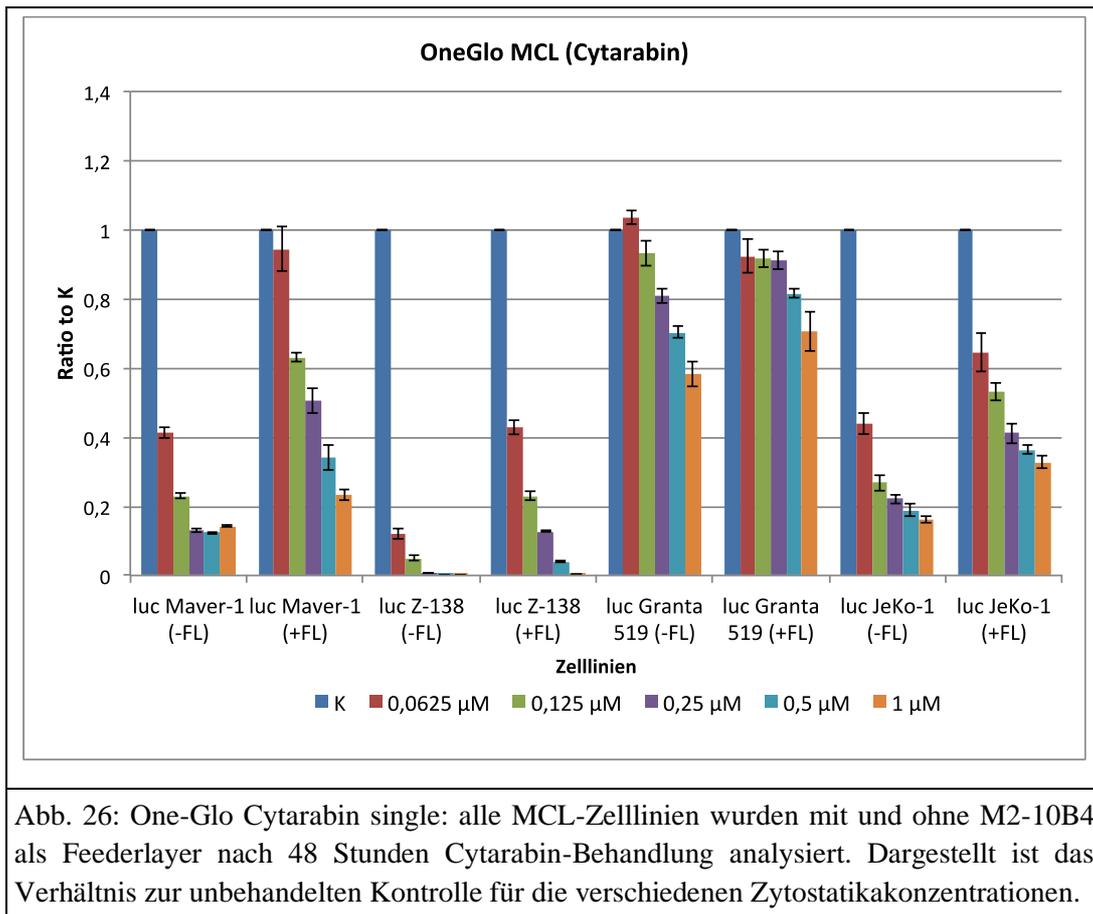


Abb. 25: Viabilität in den MCL-Zelllinien unter Behandlung mit 3,3 μ M Cytarabin in An- und Abwesenheit der M2-10B4-FL-Zellen. Die Messungen erfolgten nach 48 Stunden am Vi-Cell. Dargestellt ist die Differenz der viablen Zellen von behandelten Zelllinien zur unbehandelten Kontrolle.

4.1.3.2. One-Glo Luciferase Assay

In der Untersuchung aller vier transfizierten MCL-Linien im One-Glo Assay wurde Cytarabin zunächst in einem Konzentrationsbereich von 0,41 μM bis 6,60 μM verwendet. Dabei zeigte sich jedoch in den Zelllinien Maver-1, Z-138 und JeKo-1 bereits in der kleinsten Konzentration eine zu starke Abnahme der Luciferaseaktivität. Deshalb wurde die Verdünnungsreihe auf den Bereich 0,0625 μM bis 1 μM Cytarabin angepasst. Die Analyse erfolgte stets nach 48 Stunden, die Zelllinie M2-10B4 wurde als Feederlayer in der Ko-Kultur genutzt.



In allen Zelllinien konnte eine deutliche konzentrationsabhängige Reduktion der Luciferase-Aktivität durch die zytostatische Therapie mit Cytarabin beobachtet werden. Die stärkste Reduktion der Messwerte zeigte die Zelllinie Z-138, welche bereits bei 0,25 μM Cytarabin nur noch eine Aktivität von weniger als 1% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aufwies. Die Zelllinie Granta 519 zeigte sich am unempfindlichsten auf Cytarabin. Bei ihr wurde erst bei einer Konzentration von 3,3 μM eine mehr als 50-prozentige Reduktion der Aktivität im Verhältnis zur Kontrolle erreicht. Ebenfalls konnte in allen Zelllinien eine verminderte Wirkung von Cytarabin

auf die Lymphomzellen in Ko-Kultur mit dem Feederlayer M2-10B4 nachgewiesen werden. Diese Wirkungsabschwächung war besonders in den Linien Maver-1 und Z-138 aber auch in der JeKo-1 stark ausgeprägt. Die Zellen der Granta 519 zeigten, einhergehend mit der insgesamt schwächeren Wirkung des Zytostatikums, erst bei den höheren Konzentrationen einen Unterschied zwischen Rein- und Ko-Kultur.

4.1.3.3. Apoptose-FACS

Die Analyse der Apoptoserate unter einer zytostatischen Therapie mit Cytarabin wurde ebenfalls mit den drei Zelllinien Z-138, JeKo-1 und Mino und dem Feederlayer M2-10B4 durchgeführt. Wie bei den Zählversuchen wurde eine Cytarabinkonzentration von 3,3 μM verwendet. Die Messungen erfolgten nach 48 Stunden Inkubation mit Cytarabin.

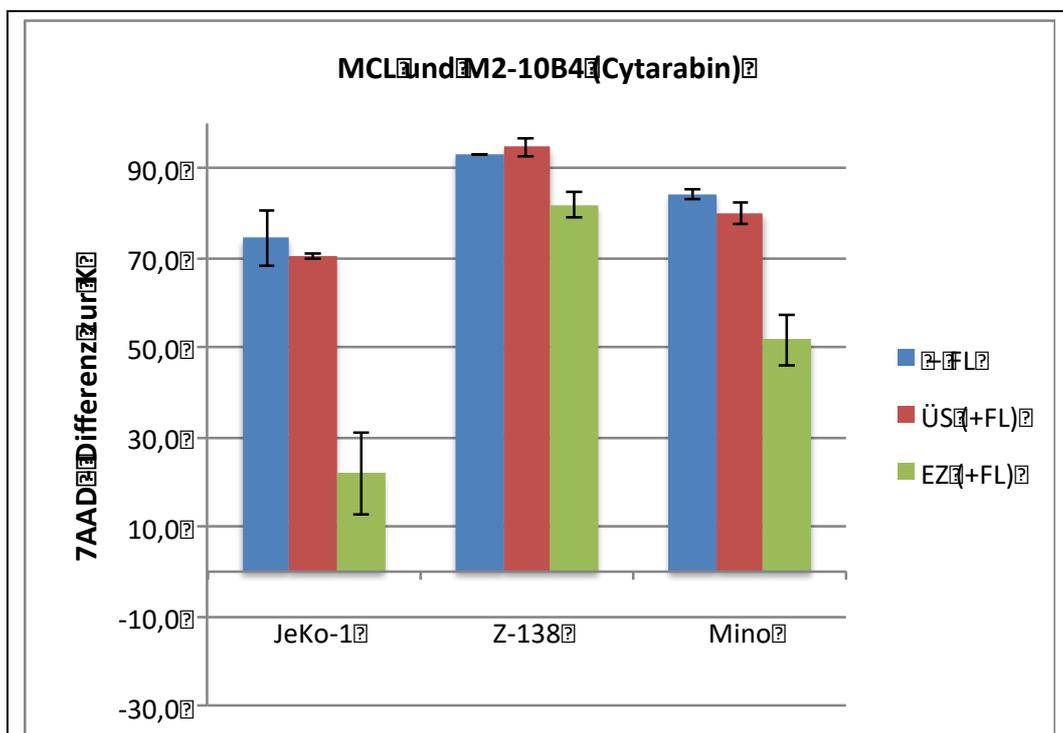


Abb. 27: Apoptose in den MCL-Zelllinien unter Behandlung mit 3,3 μM Cytarabin in An- und Abwesenheit der M2-10B4-FL-Zellen. Die Messungen erfolgten nach 48 Stunden am FACS-Calibur. Dargestellt ist die Differenz der 7AAD-positiven Zellen von behandelten Zelllinien zur unbehandelten Kontrolle.

In allen drei Zelllinien konnte in allen Fraktionen ein deutlicher Anstieg der 7AAD-positiven Zellen beobachtet werden. Es zeigten sich dabei, wie auch schon in den Proliferationsversuchen, deutliche Unterschiede zwischen den drei Kompartimenten

Reinkultur, Überstand und eingemastete Zellen. Besonders ausgeprägt waren diese in der Linie JeKo-1. Die Lymphomzellen ohne Feederlayer-Ko-Kultur zeigten eine Zunahme der Apoptoserate von 74 bis 93 Prozentpunkten (JeKo-1 74%, Z-138 93%, Mino 84%). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Zellen des Überstandes der Ko-Kultur. Hier nahmen die apoptotischen Zellen um 70 bis 95 Prozentpunkte zu (JeKo-1 70%, Z-138 95%, Mino 80%). Im Gegensatz dazu betrug die Zunahme der 7AAD-positiven Zellen in den eingemasteten Zellen nur 22 bis 82 Prozentpunkte (JeKo-1 22%, Z-138 82%, Mino 52%) (siehe auch Abb. 26). Es zeigte sich also ein ähnliches Ergebnis wie in den Proliferationsversuchen. Der Feederlayer M2-10B4 zeigte nur eine sehr geringe Differenz der Apoptoserate im niedrigen einstelligen Bereich. Die Linie Z-138 hatte insgesamt die höchsten Apoptosewerte, auch in den eingemasteten Zellen waren über 80% der Zellen apoptotisch. Doch auch hier zeigte sich ein deutlich geringeres Ansprechen dieser Zellen im Vergleich zu den anderen Fraktionen Überstand und Reinkultur. Der Anstieg der Apoptoserate korrelierte also eng mit der Abnahme der Viabilität, welche unter 4.1.3.1. beschrieben wird.

4.1.4. Idelalisib, Copanlisib, Plerixafor

Als potentielle Kombinationspartner für die Inhibitoren Abemaciclib und Ibrutinib sowie das Zytostatikum Cytarabin wurden die PI3K-Inhibitoren Idelalisib und Copanlisib sowie der CXCR4-Inhibitor Plerixafor im One-Glo Luciferase Assay analysiert.

4.1.4.1. One-Glo Luciferase Assay Idelalisib

Idelalisib wurde als single-drug mit allen vier luciferierten MCL-Linien in einer Verdünnungsreihe von 0,31 μ M bis 5 μ M untersucht. Es wurde in allen Zelllinien ein nur gering ausgeprägtes Ansprechen von maximal 17 % Reduktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet. Die Unterschiede zwischen den Zellen in Reinkultur und denen in Feederlayer-Ko-Kultur waren im Vergleich zu den Inhibitoren Abemaciclib und Ibrutinib geringer. Unter der Idelalisib-Therapie zeigte sich teilweise sogar ein stärkeres Ansprechen der Lymphomzellen in der Ko-Kultur als ohne den Einfluss des Feederlayers.

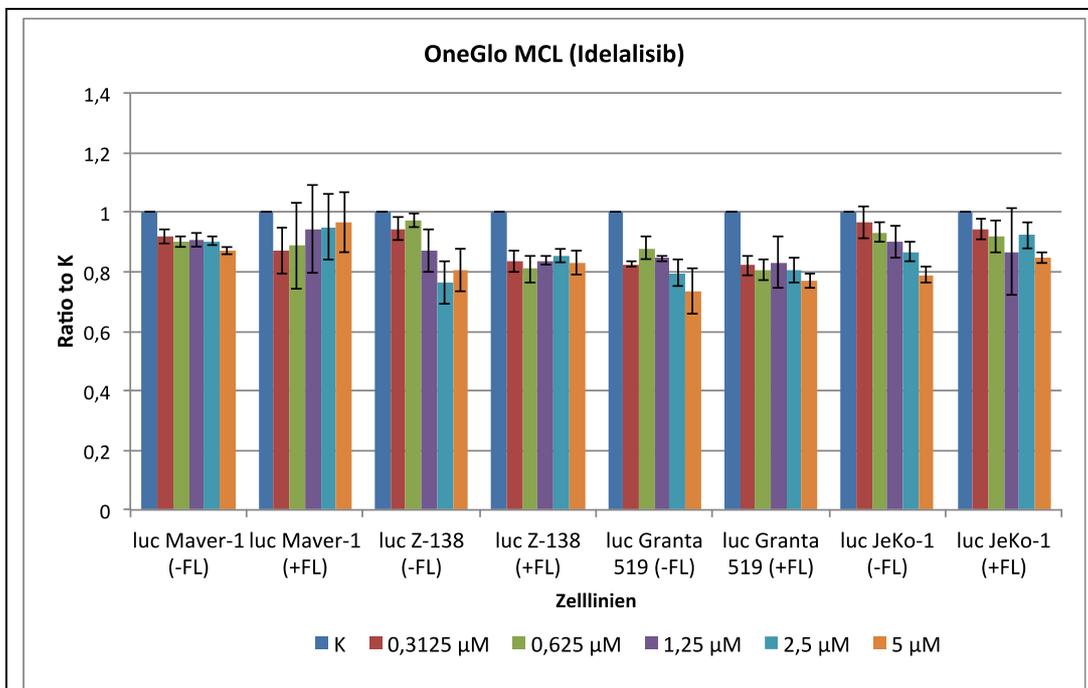


Abb. 28: One-Glo Idelalisib single: alle MCL-Zelllinien wurden mit und ohne M2-10B4 als Feederlayer nach 48 Stunden Idelalisib-Behandlung analysiert. Dargestellt ist das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle für die verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

4.1.4.2. One-Glo Luciferase Assay Copanlisib

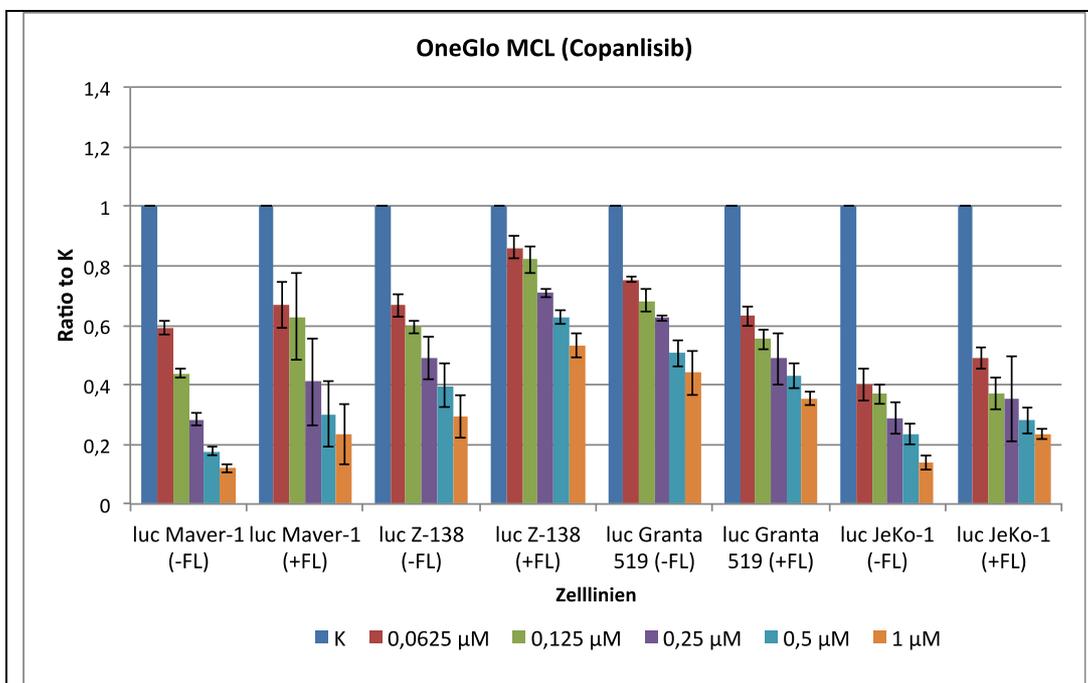


Abb. 29: One-Glo Copanlisib single: alle MCL-Zelllinien wurden mit und ohne M2-10B4 als Feederlayer nach 48 Stunden Copanlisib-Behandlung analysiert. Dargestellt ist das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle für die verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

Die Wirkung von Copanlisib wurde im Konzentrationsbereich von 0,0625 μM bis 1 μM in den vier luciferierten MCL-Linien nach 48 Stunden analysiert. Dabei zeigte sich für diese Konzentrationen eine gute Wirksamkeit des Inhibitors in allen Zelllinien. Die stärkste Inhibition konnte man in den Linien Maver-1 und JeKo-1 mit einem Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle von 0,12 beziehungsweise 0,14 beobachten. In den Lymphomzellen der Maver-1, Z-138 und JeKo-1 war die Wirkung in den Ansätzen mit Feederlayer-Ko-Kultur etwas weniger ausgeprägt als in der Reinkultur. In der Zelllinie Granta 519 zeigte sich dieses Verhältnis gerade umgekehrt.

4.1.4.3. One-Glo Luciferase Assay Plerixafor

Mit dem CXCR4-Inhibitor Plerixafor wurde der One-Glo Ansatz mit den vier luciferierten MCL-Linien in einer Verdünnungsreihe von 0,31 μM bis 5 μM nach 48 Stunden analysiert. Alle untersuchten Zelllinien sprachen in diesem Konzentrationsbereich nur schwach auf den Inhibitor an. Das niedrigste Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle lag bei 0,87. In allen Zelllinien konnte aber die einheitliche Beobachtung gemacht werden, dass die Luciferaseaktivität in den Lymphomzellen mit FL-Ko-Kultur stärker inhibiert wurde als in den MCL-Zellen in Reinkultur.

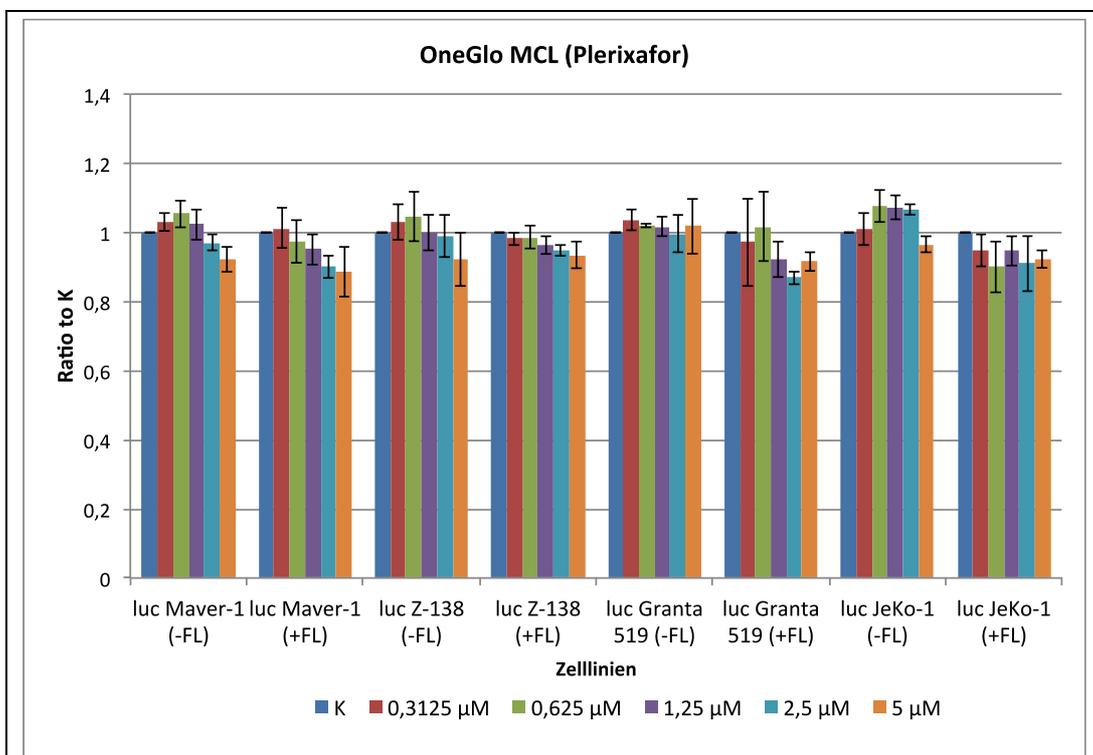


Abb. 30: One-Glo Plerixafor single: alle MCL-Zelllinien wurden mit und ohne M2-10B4 als Feederlayer nach 48 Stunden Plerixafor-Behandlung analysiert. Dargestellt ist das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle für die verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

4.2. Kombinationen

4.2.1. Abemaciclib und Ibrutinib

4.2.1.1. One-Glo Luciferase Assay mit dem murinen Feederlayer

Die Untersuchung der Wirkung einer Kombination der beiden Inhibitoren Abemaciclib und Ibrutinib wurde zunächst im One-Glo Luciferase Assay mit den vier luciferase-transfizierten Zelllinien und dem murinen stromalen Feederlayer M2-10B4 durchgeführt. Die Messungen erfolgten nach 48 Stunden. Abemaciclib wurde in einem Konzentrationsbereich von 15,6 nM bis 250 nM verwendet, Ibrutinib wurde in einer Verdünnungsreihe von 0,31 μ M bis 5 μ M bereitgestellt. Die einzelnen Zelllinien wurden sodann jeweils mit den beiden Therapeutika alleine sowie mit der Kombination behandelt. Neben der Berechnung des Verhältnisses zur unbehandelten Kontrolle und deren graphischen Darstellung wurde das Fractional Product (FP) für die Inhibitorkombinationen berechnet.

Die untersuchten Lymphomzellen zeigten bei allen verwendeten Konzentrationen ein jeweils sehr ähnliches Ergebnis im Verhältnis der Single-Therapie zur Kombinationstherapie. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird deshalb in der nachfolgenden Grafik (Abb. 31) die repräsentative Ratio to K für die Konzentrationen Abemaciclib 62,5 nM und Ibrutinib 1,25 μ M sowie für die MCL-Linie JeKo-1 im gesamten Konzentrationsbereich dargestellt.

Für jeden der beiden Inhibitoren wie auch für die Kombination wurde eine konzentrationsabhängig ansteigende Wirkung in allen Zelllinien beobachtet. Die stärkste Wirkung der Kombinationstherapie zeigte sich in der Linie JeKo-1 mit einem Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle von 0,08 in der Reinkultur und 0,24 in der Feederlayer-Ko-Kultur. Es konnte in fast allen MCL-Zellen mit und ohne FL eine stärkere Wirkung der Kombination im Vergleich zur Single-Therapie beobachtet werden. Nur in der Linie Granta 519 mit FL-Ko-Kultur war das Verhältnis zur Kontrolle in der Kombinationstherapie zwar stärker gesunken als in der Abemaciclib-Single-Therapie, aber weniger stark als in der Ibrutinib-Single-Therapie.

Bei der Berechnung des Fractional Product für die verschiedenen Zelllinien zeigte sich in der Linie Z-138 sowohl mit als auch ohne Feederlayereinfluss ein Synergismus für die Kombination aus Abemaciclib und Ibrutinib. Die FPs für die JeKo-1 zeigten in beiden Kompartimenten teils einen synergistischen, teils einen additiven Effekt. Ebenso verhielt es sich bei der Linie Maver-1. Bei den Zellen der Granta 519 ließ sich in der

Reinkultur ein Synergismus beobachten, bei der FL-Ko-Kultur ergab sich hingegen ein antagonistischer Effekt. Eine Übersicht ist unter 4.2.1.2. abgebildet (siehe Tab. 1).

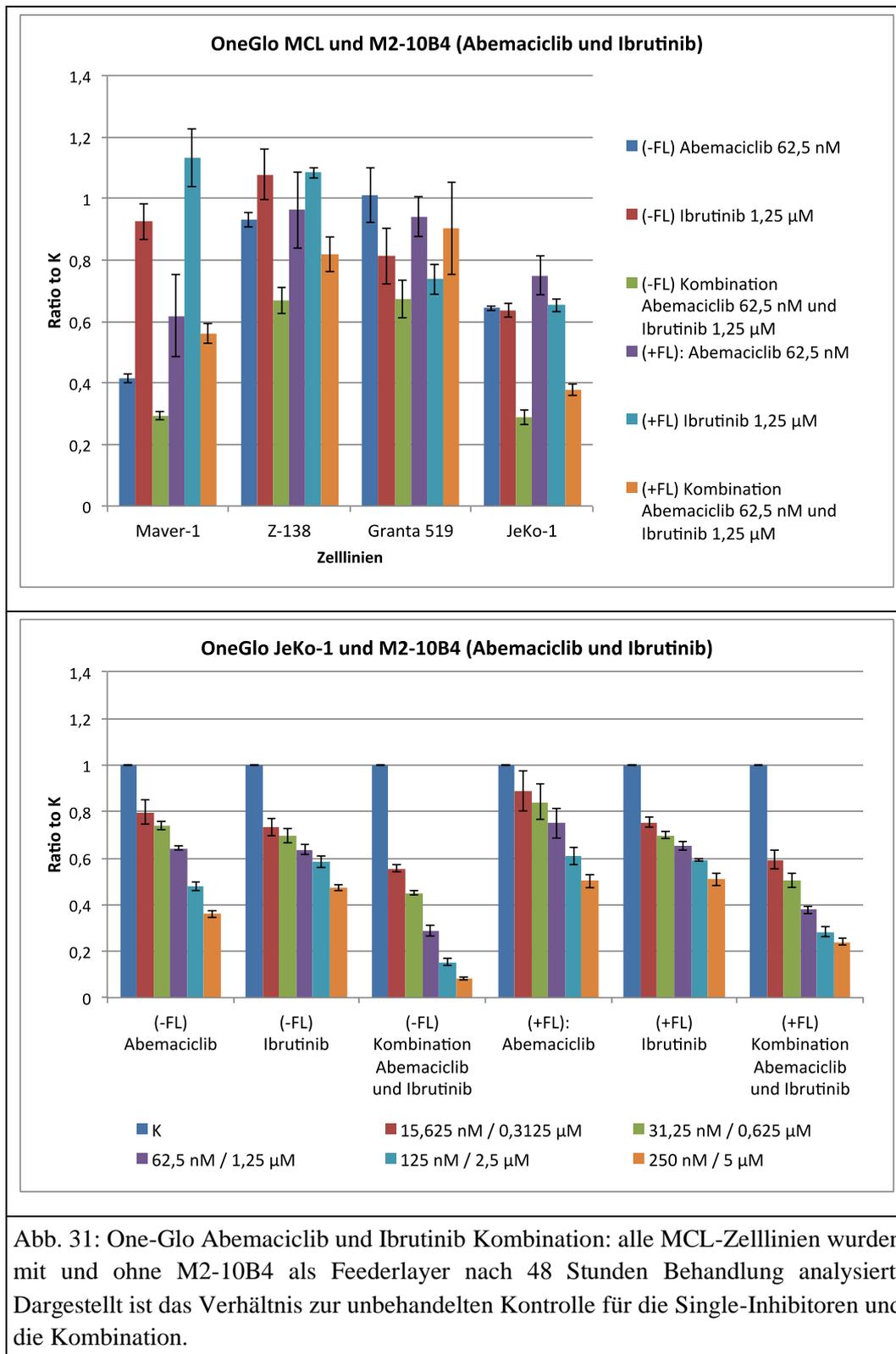


Abb. 31: One-Glo Abemaciclib und Ibrutinib Kombination: alle MCL-Zelllinien wurden mit und ohne M2-10B4 als Feederlayer nach 48 Stunden Behandlung analysiert. Dargestellt ist das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle für die Single-Inhibitoren und die Kombination.

4.2.1.2. One-Glo Luciferase Assay mit dem humanen Feederlayer

Um eine Vergleichbarkeit des verwendeten murinen Feederlayers M2-10B4 mit dem humanen Feederlayer HS-5 zu zeigen wurde der unter 4.2.1.1. beschriebene Versuch erneut mit den Zellen der HS-5 und identischen Inhibitoren durchgeführt.

Insgesamt zeigte sich ein sehr ähnliches Ergebnis im Vergleich zum vorherigen Versuch. Es konnte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Wirkung für beide Inhibitoren und die Kombination beobachtet werden. Am empfindlichsten auf die Therapeutika zeigte sich erneut die Linie JeKo-1, wengleich auch die Linien Maver-1 und Z-138 ein gutes Ansprechen aufwiesen. Lediglich die Linie Granta 519 verhielt sich in Ko-Kultur mit dem FL HS-5 anders als mit dem murinen Feederlayer.

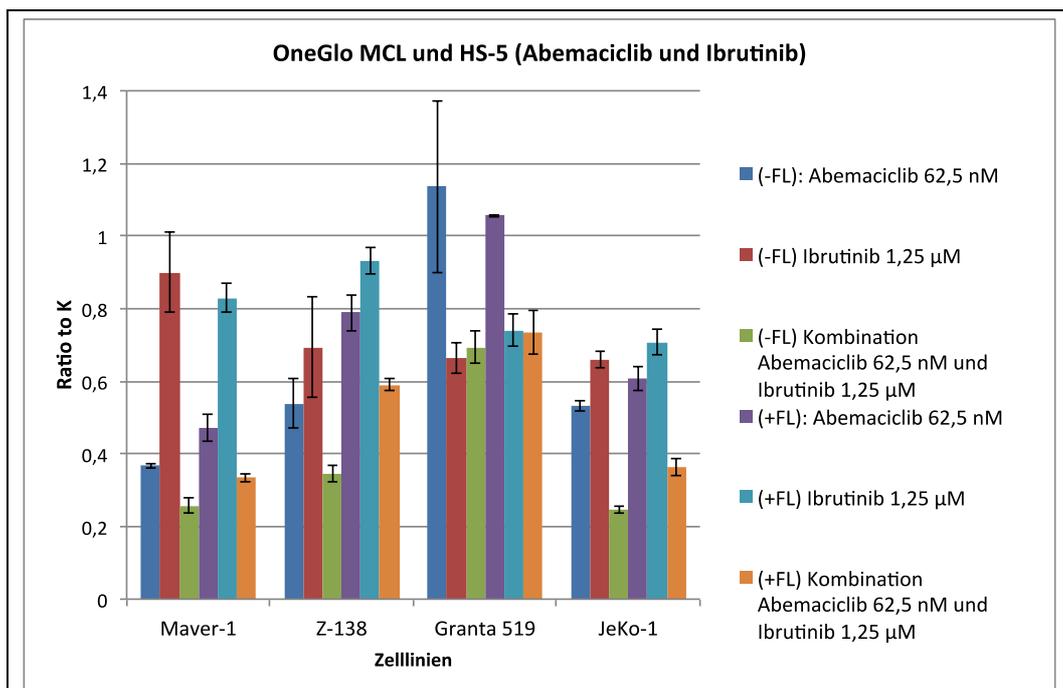


Abb. 32: One-Glo Abemaciclib und Ibrutinib Kombination: alle MCL-Zelllinien wurden mit und ohne HS-5 als Feederlayer nach 48 Stunden Behandlung analysiert. Dargestellt ist das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle für die Single-Inhibitoren und die Kombination.

Der Antagonismus ließ sich nicht nachvollziehen, es zeigte sich eine additive Wirkung der beiden Inhibitoren. Bei den anderen drei Zelllinien konnte die additive bis synergistische Wirkung analog zur Ko-Kultur mit der Linie M2-10B4 nachgewiesen werden. Mit einem Signifikanzniveau von 95% zeigte sich etwa bei einem Drittel der Konzentrationen ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen mit den beiden unterschiedlichen Feederlayern. Setzt man das Signifikanzniveau bei 99% fest, so sind fast alle Ergebnisse nicht signifikant unterschiedlich. Nur in der Zelllinie Maver-

1 ergibt sich für einige Messwerte von Ibrutinib sowie für die Ergebnisse der Kombinationstherapie ein $p < 0,01$ für die verschiedenen FL-Ko-Kulturen.

	Maver-1 (-FL)	Maver-1 (+M2-10B4)	Maver-1 (+HS-5)	Z-138 (-FL)	Z-138 (+M2-10B4)	Z-138 (+HS-5)
K	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15,625 nM / 0,3125 µM	-0,014	0,116	-0,023	0,253	0,045	0,162
31,25 nM / 0,625 µM	0,104	0,045	0,053	0,228	0,126	0,102
62,5 nM / 1,25 µM	0,090	0,140	0,057	0,336	0,225	0,146
125 nM / 2,5 µM	0,065	-0,016	0,025	0,316	0,159	0,119
250 nM / 5 µM	0,035	0,139	-0,013	0,175	0,138	0,098

	Granta 519 (-FL)	Granta 519 (+M2-10B4)	Granta 519 (+HS-5)	JeKo-1 (-FL)	JeKo-1 (+M2-10B4)	JeKo-1 (+HS-5)
K	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15,625 nM / 0,3125 µM	0,150	-0,183	0,168	0,029	0,077	0,021
31,25 nM / 0,625 µM	0,137	-0,203	0,086	0,065	0,083	0,073
62,5 nM / 1,25 µM	0,151	-0,208	0,046	0,122	0,112	0,065
125 nM / 2,5 µM	0,135	-0,222	0,131	0,126	0,078	0,053
250 nM / 5 µM	-0,037	-0,189	0,098	0,089	0,014	0,033

Tab. 1: Fractional Products der One-Glo Versuche mit der Kombination aus Abemaciclib und Ibrutinib. Es sind die Ergebnisse für die MCL-Linien Maver-1, Z-138, Granta 519 und JeKo-1 jeweils in Reinkultur und den unterschiedlichen FL-Zellen M2-10B4 und HS-5 abgebildet. Dargestellt ist das berechnete FP, die Felder sind für antagonistische Werte rot, für additive Werte gelb und für synergistische Werte grün eingefärbt.

4.2.2. Abemaciclib und Plerixafor

Die Kombination aus Abemaciclib und dem CXCR4-Inhibitor Plerixafor wurde im One-Glo Luciferase Assay mit der MCL-Linie JeKo-1 nach 48 Stunden Inkubation untersucht. Abemaciclib wurde dabei mit Konzentrationen von 15,6 nM bis 250 nM, Plerixafor im Bereich von 0,31 µM bis 5 µM verwendet.

	JeKo-1 (-FL)	JeKo-1 (+FL)
K	0,000	0,000
15,625 nM / 0,3125 µM	-0,196	-0,175
31,25 nM / 0,625 µM	-0,061	0,036
62,5 nM / 1,25 µM	-0,053	0,052
125 nM / 2,5 µM	-0,020	0,032
250 nM / 5 µM	-0,014	0,045

Tab. 2: Fractional Products der One-Glo Versuche mit der Kombination aus Abemaciclib und Plerixafor. Es sind die Ergebnisse für die MCL-Linie JeKo-1 in An- und Abwesenheit des FL M2-10B4 abgebildet. Dargestellt ist das berechnete FP, die Felder sind für antagonistische Werte rot, für additive Werte gelb und für synergistische Werte grün eingefärbt.

Wie schon in den Single-Versuchen mit Plerixafor unter 4.1.4.3. gezeigt hat der CXCR4-Inhibitor alleine nur wenig Einfluss auf die Luciferase-Aktivität der Lymphomzellen. So konnte man auch in der Kombination mit Abemaciclib zwar keinen synergistischen, aber zumindest einen additiven Effekt im Vergleich zu den einzelnen Inhibitoren beobachten. Dabei fällt bei Betrachtung der Fractional Products ein Unterschied zwischen den MCL-Zellen in Reinkultur und denen mit Feederlayer auf. Das FP ist bei den Zellen mit FL zwar nicht synergistisch, aber doch konstant etwas höher als in den Zellen ohne FL. Dies steht analog zur Beobachtung aus den Single-Versuchen, in denen Plerixafor eine etwas stärkere Wirkung in den Lymphomzellen mit FL-Ko-Kultur gezeigt hatte.

4.2.3. Ibrutinib und Cytarabin

4.2.3.1. One-Glo Luciferase Assay

Die One-Glo Untersuchung der Kombination aus Ibrutinib und dem Zytostatikum Cytarabin wurde mit den MCL-Zellen von Maver-1, Z-138, JeKo-1 und Granta 519 nach 48 Stunden analysiert. Cytarabin wurde in der Verdünnungsreihe von 0,0625 μM bis 1 μM verwendet, Ibrutinib in Konzentrationen von 0,31 μM bis 5 μM .

Wie in den Single-Ansätzen so zeigte sich auch in der Kombination in allen Zelllinien eine konzentrationsabhängig ansteigende Wirkung. Den stärksten Effekt konnte man erneut in der Zelllinie Z-138 beobachten. Auch die Linien Maver-1 und JeKo-1 zeigten ein sehr gutes Ansprechen. Die Zellen der Granta 519 waren etwas unempfindlicher sowohl gegen die Single-Ansätze als auch gegen die Kombination. Es konnte in allen Ansätzen ohne Feederlayereinfluss eine sehr gute additive Wirkung der beiden Substanzen beobachtet werden. Bei den Lymphomzellen in der FL-Ko-Kultur lässt sich sogar ein synergistischer Effekt der beiden Therapeutika nachweisen. Dies ist bereits in der graphischen Darstellung des Verhältnisses zur Kontrolle sehr gut zu erkennen und auch die Berechnung der Fractional Products zeigt den Synergismus. Einzig in der Linie Z-138 ist kein überwiegender Synergismus zu erkennen, allerdings war schon die Wirkung von Cytarabin alleine sehr stark ausgeprägt, so dass bei den höheren Konzentrationen fast keine Luciferaseaktivität mehr messbar war.

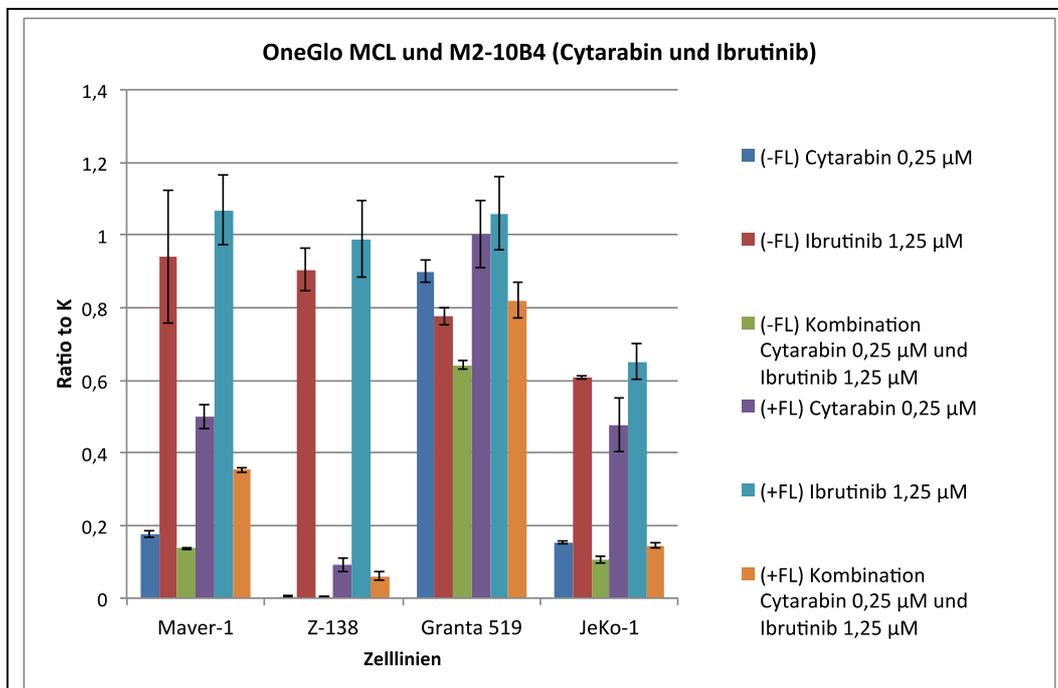


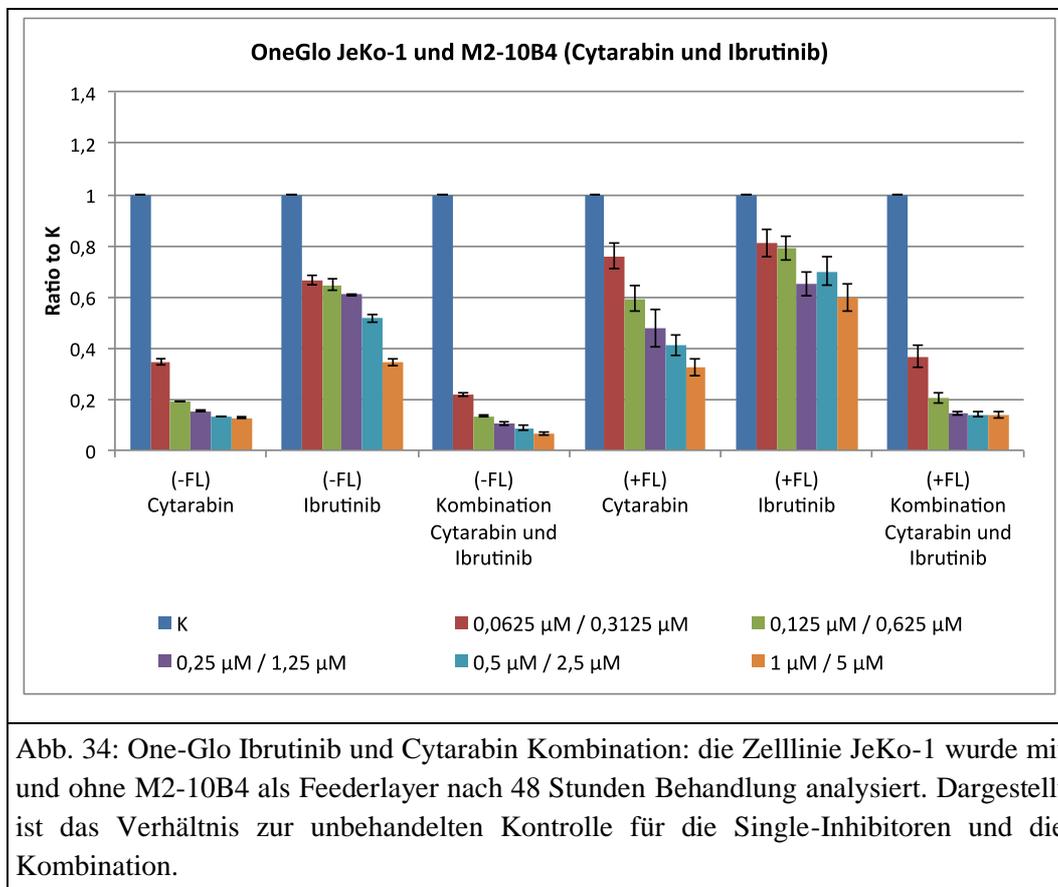
Abb. 33: One-Glo Ibrutinib und Cytarabin Kombination: alle MCL-Zelllinien wurden mit und ohne M2-10B4 als Feederlayer nach 48 Stunden Behandlung analysiert. Dargestellt ist das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle für die Single-Inhibitoren und die Kombination.

	Maver-1 (-FL)	Maver-1 (+FL)	Z-138 (-FL)	Z-138 (+FL)	Granta 519 (-FL)	Granta 519 (+FL)	JeKo-1 (-FL)	JeKo-1 (+FL)
K	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,0625µM / 0,3125µM	0,029	0,118	0,015	0,121	0,067	0,091	0,014	0,249
0,125µM / 0,625µM	0,020	0,125	0,004	0,066	0,026	0,256	-0,009	0,263
0,25µM / 1,25µM	0,029	0,180	0,000	0,030	0,056	0,244	-0,011	0,166
0,5µM / 2,5µM	0,015	0,116	0,000	0,016	0,020	0,027	-0,018	0,146
1µM / 5µM	0,022	0,043	0,000	0,002	-0,010	0,118	-0,023	0,055

Tab. 3: Fractional Products der One-Glo Versuche mit der Kombination aus Ibrutinib und Cytarabin. Es sind die Ergebnisse für die MCL-Linien Maver-1, Z-138, Granta 519 und JeKo-1 in An- und Abwesenheit des FL M2-10B4 abgebildet.

Dargestellt ist das berechnete FP, die Felder sind für antagonistische Werte rot, für additive Werte gelb und für synergistische Werte grün eingefärbt.

In den beiden Diagrammen wird das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle sowohl mit als auch ohne Feederlayer-Ko-Kultur dargestellt. Am deutlichsten ist in der Zelllinie JeKo-1 der protektive Effekt des FL-Einflusses zu erkennen. Die Wirkung des Zytostatikums Cytarabin ist in den Lymphomzellen mit FL bei allen Konzentrationen deutlich herabgesetzt. Der Unterschied beträgt je nach Konzentration 20 bis 41 Prozentpunkte. Bei der Kombination von Cytarabin mit Ibrutinib bleibt dieser Unterschied zwar meist statistisch signifikant, wird dabei aber deutlich kleiner und beträgt nur noch zwischen 4 und 15 Prozentpunkten.



4.2.3.2. Zählversuch und Apoptose-FACS

Die Proliferationsversuche sowie die Analysen der Apoptoserate wurden für die Lymphomzellen der Z-138, JeKo-1 und Mino in An- und Abwesenheit des Feederlayer M2-10B4 durchgeführt. Die Messungen erfolgten dabei stets nach 48 Stunden. Cytarabin wurde in einer Konzentration von 1 μ M verwendet, Ibrutinib mit einer Konzentration von 5 μ M.

Die deutlichsten Ergebnisse konnten in der Line JeKo-1 beobachtet werden. Im Proliferationsversuch kam es unter Cytarabin-Single-Therapie zu einer Abnahme der Zellzahl auf 17% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Zahl der Lymphomzellen im Überstand ging ebenfalls auf 22% zurück, die Zahl der eingesteten MCL-Zellen hingegen zeigte lediglich eine Abnahme auf 41% im Vergleich zur Kontrolle. Sowohl der Unterschied zwischen Reinkultur und EZ als auch zwischen ÜS und EZ erwies sich als signifikant ($p < 0,001$ beziehungsweise $p < 0,01$). In der Kombination von Cytarabin mit Ibrutinib verminderte sich dieser Unterschied deutlich. Die Zellen in Reinkultur gingen auf 18%, die im Überstand der Ko-Kultur auf 22% im Verhältnis zu Kontrolle zurück. Die eingesteten Zellen zeigten nun ein ähnliches Ansprechen mit einer Zellzahl von 26% im Vergleich zur unbehandelten

Kontrolle und zeigten somit weder zur Reinkultur noch zum Überstand einen signifikanten Unterschied (vgl. Abb. 35). In der Zelllinie Z-138 zeigte sich ebenfalls ein verbessertes Ansprechen der eingenisteten Zellen auf die Kombination im Vergleich zur Single-Therapie von 64% vs. 77% Verhältnis zur Kontrolle. Der Unterschied der EZ zur Reinkultur respektive dem Überstand blieb zwar signifikant, jedoch nur auf einem geringeren Niveau ($p < 0,01$ Cytarabin-single, $p < 0,05$ Kombination). In den Zellen der Mino konnte keine Verbesserung der Ansprechrate durch die Kombinationstherapie erzielt werden.

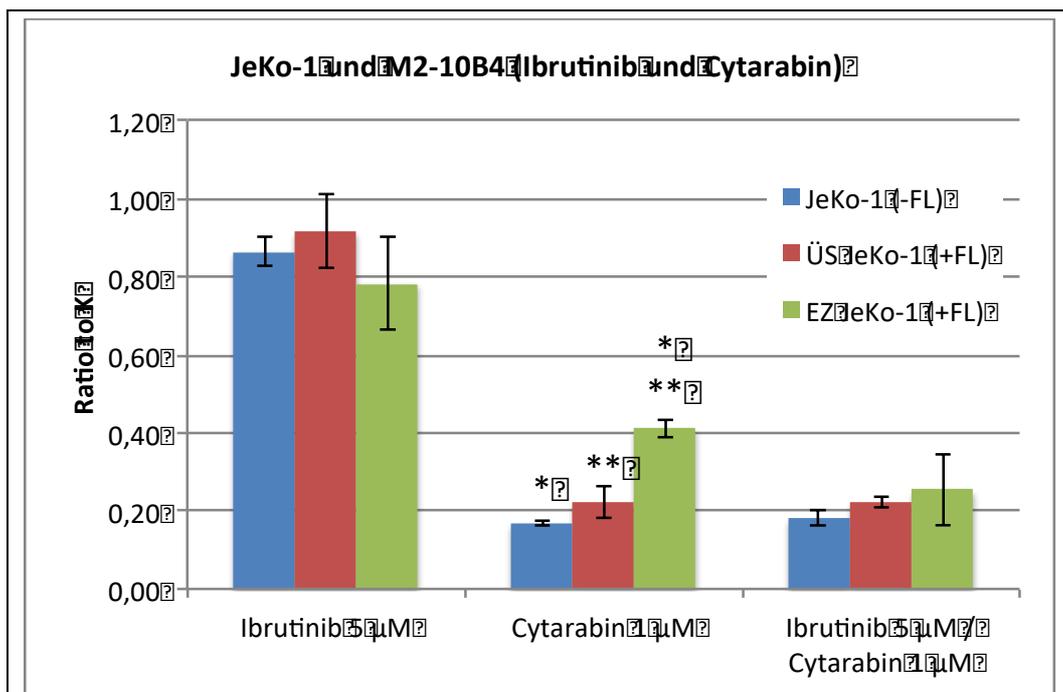


Abb. 35: Zellzahlbestimmung der Linie JeKo-1 unter Behandlung mit 1 μ M Cytarabin und 5 μ M Ibrutinib in An- und Abwesenheit der M2-10B4-FL-Zellen. Die Messungen erfolgten nach 48 Stunden am Vi-Cell. Dargestellt ist das Verhältnis der Zellzahl der behandelten Zellen zur unbehandelten Kontrolle.

Markiert sind signifikant unterschiedliche Verhältnisse zur Kontrolle zwischen MCL-Reinkultur und eingenisteten Zellen (*) und zwischen Überstand und eingenisteten Zellen (**).

Die Analyse des Anteils der Lymphomzellen in der FL-Ko-Kultur, welche sich eingenistet haben, liefert ein ähnliches Ergebnis. Bei allen drei Linien steigt der Anteil der eingenisteten Zellen unter der Cytarabin-Therapie stark an, bei der JeKo-1 beispielsweise von 24% auf 37%. Durch die Kombination mit Ibrutinib konnte dieser Anstieg in der Zelllinie JeKo-1 deutlich vermindert werden (von 24% auf 26%). Auch in der Z-138 wird der Anstieg etwas vermindert, in der Mino zeigt sich kein Effekt.

Die durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate unter der Kombinationstherapie zeigt ein analoges Bild zum Proliferationsversuch. Bei den Zellen der JeKo-1 in Reinkultur und im Überstand der Ko-Kultur kommt es zu einer Zunahme der Apoptoserate unter Cytarabin von deutlich über 70 Prozentpunkten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die eingenisteten Zellen weisen hingegen nur eine Zunahme um 44 Prozentpunkte auf. Unter Kombination von Cytarabin und Ibrutinib kommt es zwar zu einem geringen Rückgang der 7AAD-Differenz in den Zellen ohne Feederlayer und im Überstand, die Zunahme im Vergleich zur Kontrolle beträgt aber nach wie vor mehr als 70 Prozentpunkte. In den eingenisteten Zellen kam es unter der Kombinationstherapie zu einer signifikanten ($p < 0,001$) Zunahme der 7AAD-positiven Zellen um 54 Prozentpunkte. Die Zellen der Z-138 zeigten in der Reinkultur eine Zunahme der 7AAD-Differenz von 45 auf 56 Prozentpunkten unter der Kombinationstherapie. Im Überstand erhöhte sich die 7AAD-Zunahme von 6 auf 19 Prozentpunkte. Auch in den eingenisteten Zellen konnte eine signifikante Zunahme von 7 auf 17 Prozentpunkte ($p < 0,01$) beobachtet werden. In der MCL-Linie Mino konnte erneut kein signifikanter Unterschied der Kombination gegenüber der Cytarabin-Single-Therapie festgestellt werden.

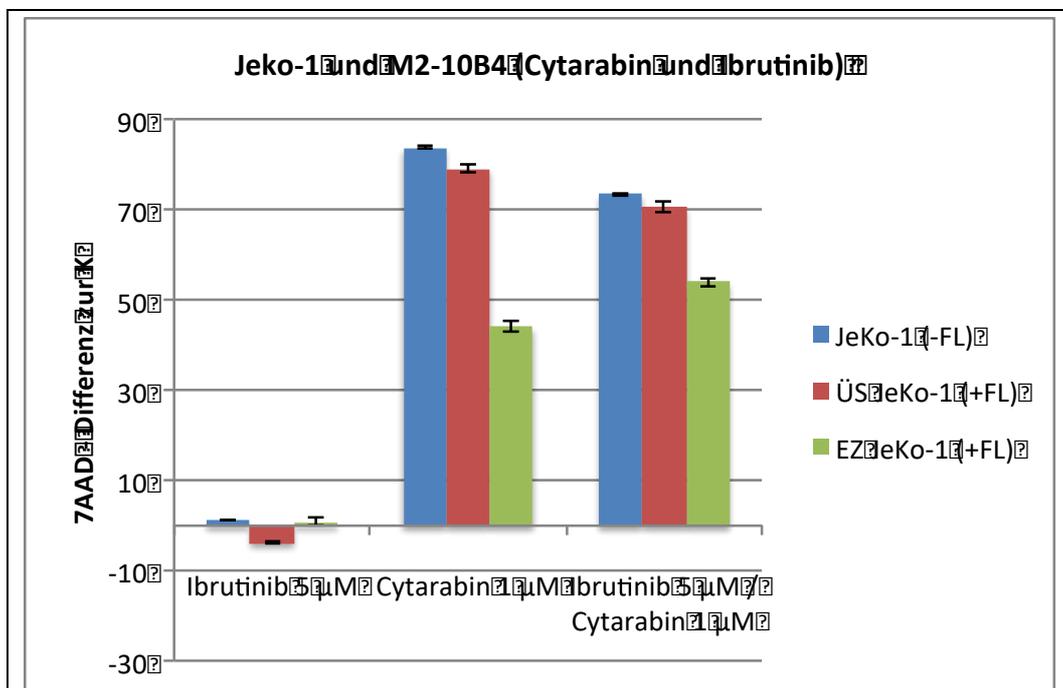


Abb. 36: Apoptose der Linie JeKo-1 unter Behandlung mit 1 µM Cytarabin und 5 µM Ibrutinib in An- und Abwesenheit der M2-10B4-FL-Zellen. Die Messungen erfolgten nach 48 Stunden am FACS-Calibur. Dargestellt ist die Differenz der 7AAD-positiven Zellen von behandelten Zelllinien zur unbehandelten Kontrolle.

Zusammenfassend konnte in zwei Zelllinien eine deutliche Wirkungsverstärkung durch die Kombinationstherapie von Cytarabin und Ibrutinib in der Induktion der Apoptose beobachtet werden. In den eingenisteten Zellen stieg die Apoptoserate durch die Kombination stark an, wenngleich nach wie vor ein deutlicher Unterschied zu den Zellen der Reinkultur bestand.

4.2.4. Ibrutinib und Plerixafor

Die beiden Inhibitoren Ibrutinib und Plerixafor wurden in der Kombination mit den luciferierten MCL-Linien Maver-1, Z-138, Granta 519 und JeKo-1 und dem Feederlayer M2-10B4 im One-Glo Luciferase Assay nach 48 Stunden Inkubation untersucht. Dabei wurden beide Therapeutika in einem Konzentrationsbereich von 0,31 μM bis 5 μM verwendet.

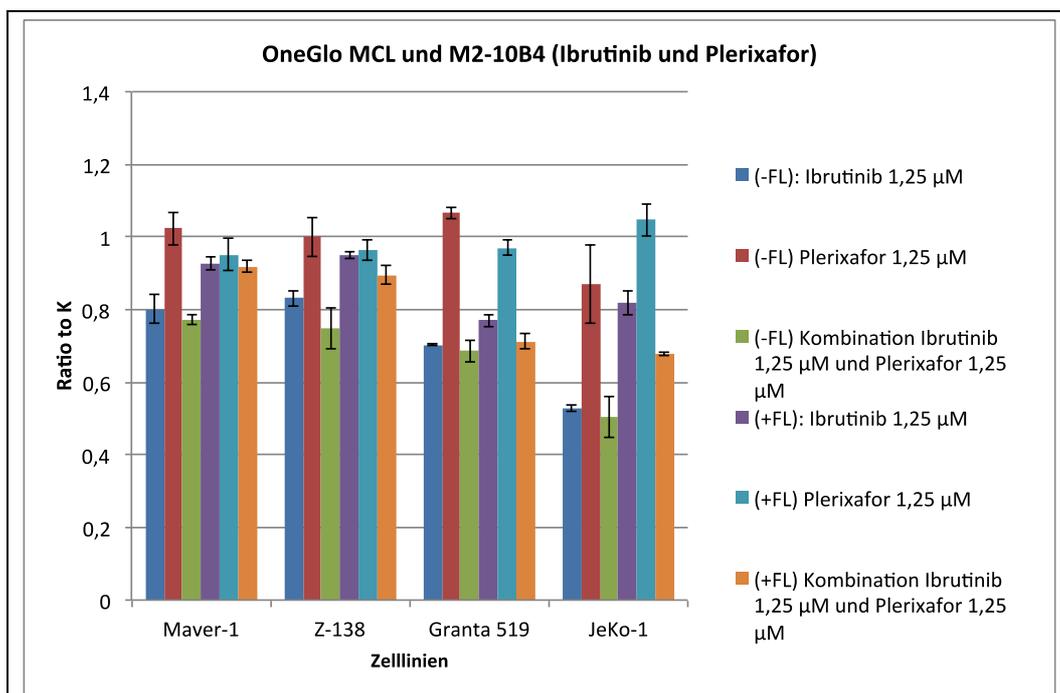


Abb. 37: One-Glo Ibrutinib und Plerixafor Kombination: alle MCL-Zelllinien wurden mit und ohne M2-10B4 als Feederlayer nach 48 Stunden Behandlung analysiert. Dargestellt ist das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle für die Single-Inhibitoren und die Kombination.

Es zeigt sich bei allen Zellen für die Single-Therapie mit Plerixafor wie schon unter 4.1.4.3. beschrieben kaum eine Reduktion der Luciferaseaktivität. In der Kombination mit Ibrutinib zeigt sich bei allen Lymphomzellen in Reinkultur bei der Berechnung des Fractional Product lediglich ein additiver Effekt. In der Ko-Kultur mit dem Feederlayer

zeigte sich für die Zelllinien Maver-1, Z-138 und Granta 519 ebenso ein additiver Effekt in der graphischen Analyse sowie im FP. Für die Zellen der JeKo-1 konnte eine Wirkungssteigerung durch die Kombination beobachtet werden, welche sich durch das synergistische Fractional Product bestätigt.

4.2.5. PI3K-Inhibitoren

4.2.5.1. Idelalisib und Cytarabin

Die Kombination des PI3K-Inhibitors Idelalisib und des Zytostatikums Cytarabin wurde mit den luciferierten MCL-Linien Maver-1, Z-138, Granta 519 und JeKo-1 sowie dem Feederlayer M2-10B4 im One-Glo Luciferase Assay untersucht. Cytarabin wurde dabei in Konzentrationen von 0,0625 μM bis 1 μM , Idelalisib von 0,31 μM bis 5 μM verwendet. Die Analyse erfolgte nach 48 Stunden.

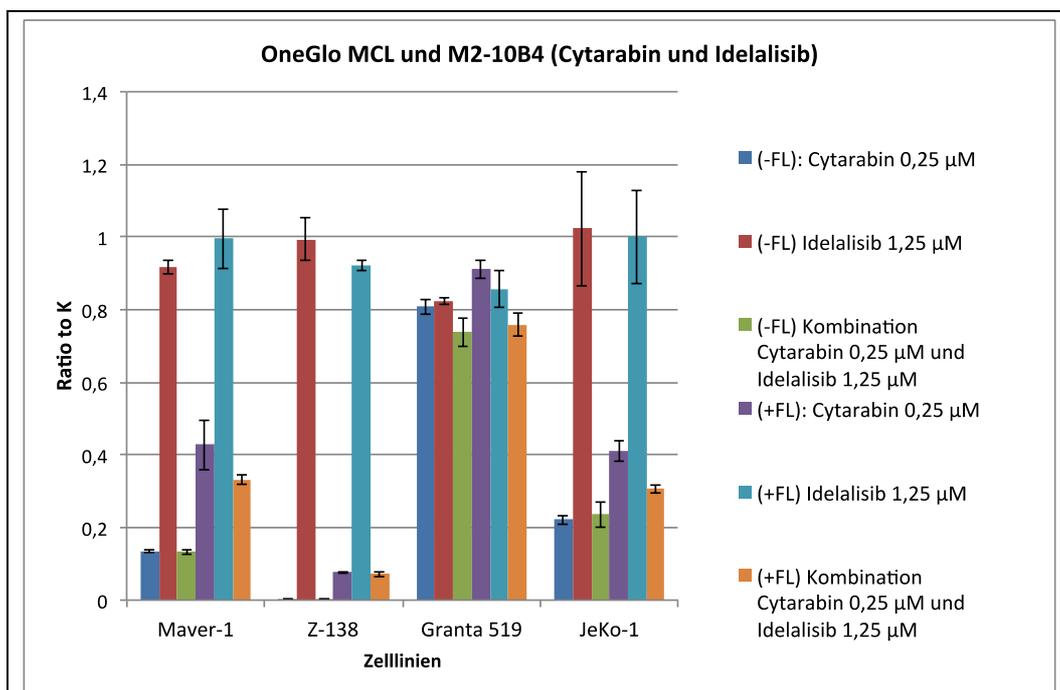


Abb. 38: One-Glo Idelalisib und Cytarabin Kombination: alle MCL-Zelllinien wurden mit und ohne M2-10B4 als Feederlayer nach 48 Stunden Behandlung analysiert. Dargestellt ist das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle für die Single-Inhibitoren und die Kombination.

In allen vier Zelllinien konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt der Kombination sowohl in den Zellen der Reinkultur als auch der FL-Ko-Kultur beobachtet werden. Der Unterschied zwischen den beiden Fraktionen, der in der Single-Behandlung mit Cytarabin stark ausgeprägt ist, reduziert sich durch die Kombinationsbehandlung in

allen Zelllinien merklich. Die maximal aufgetretenen Unterschiede zwischen den Fraktionen betragen in der Maver-1 0,41 bzw. 0,31 Prozentpunkte, in der Z-138 0,20 bzw. 0,16 Prozentpunkte, in der JeKo-1 0,26 bzw. 0,14 Prozentpunkte und in der Granta 519 0,12 bzw. 0,09 Prozentpunkte.

Bei der Berechnung der Fractional Products konnte ein additiver Effekt der Kombinationstherapie in allen Zelllinien in Reinkultur beobachtet werden. Als additiv erwies sich auch die Wirkung in der Ko-Kultur der MCL-Linien Maver-1, Z-138 und Granta 519. Die Zellen der JeKo-1 zeigten einen Synergismus der Kombinationstherapie in Anwesenheit des Feederlayers und auch für Maver-1 ergab sich in der niedrigen Konzentration eine synergistische Wirkung.

	Maver-1 (-FL)	Maver-1 (+FL)	Z-138 (-FL)	Z-138 (+FL)	Granta 519 (-FL)	Granta 519 (+FL)	JeKo-1 (-FL)	JeKo-1 (+FL)
K	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,0625µM / 0,3125µM	0,023	0,224	0,015	0,042	0,074	-0,081	-0,020	0,079
0,125µM / 0,625µM	0,002	0,086	0,004	0,027	-0,012	-0,040	0,003	0,116
0,25µM / 1,25µM	-0,009	0,093	0,001	-0,001	-0,073	0,022	-0,010	0,105
0,5µM / 2,5µM	-0,008	0,060	0,000	0,000	-0,048	-0,020	0,009	0,110
1µM / 5µM	-0,018	0,023	0,000	0,000	0,038	0,094	0,019	0,110

Tab. 4: Fractional Products der One-Glo Versuche mit der Kombination aus Idelalisib und Cytarabin. Es sind die Ergebnisse für die MCL-Linien Maver-1, Z-138, Granta 519 und JeKo-1 in An- und Abwesenheit des FL M2-10B4 abgebildet.

Dargestellt ist das berechnete FP, die Felder sind für antagonistische Werte rot, für additive Werte gelb und für synergistische Werte grün eingefärbt.

4.2.5.2. Idelalisib und Plerixafor

Idelalisib und Plerixafor in der Kombination wurden im One-Glo Luciferase Assay nach 48 Stunden Inkubation mit den luciferierten MCL-Linien Maver-1, Z-138, Granta 519 und JeKo-1 untersucht. Beide Inhibitoren wurden im Konzentrationsbereich von 0,31 µM bis 5 µM verwendet.

Für Plerixafor zeigte sich das aus dem Single-Ansatz bekannte nur gering ausgeprägte Ansprechen sowohl in der Reinkultur als auch mit dem Feederlayer. In der Kombination mit Idelalisib ergab sich für die Zellen in der Reinkultur kein relevanter Unterschied zur Single-Therapie mit Idelalisib, was durch die kaum vorhandene Single-Plerixafor-Wirkung ein additives Fractional Product ergibt. Das synergistische FP für die Z-138 entstand durch die erhöhte Ratio to K unter Single-Plerixafor und ist deshalb nicht verwertbar. In der Feederlayer-Ko-Kultur zeigt sich für die Zellen der Z-138 ebenfalls

ein additiver Effekt der Kombination. Bei den Zelllinien Maver-1, Granta 519 und JeKo-1 hingegen kann in den höheren Konzentrationen ein synergistisches FP berechnet werden.

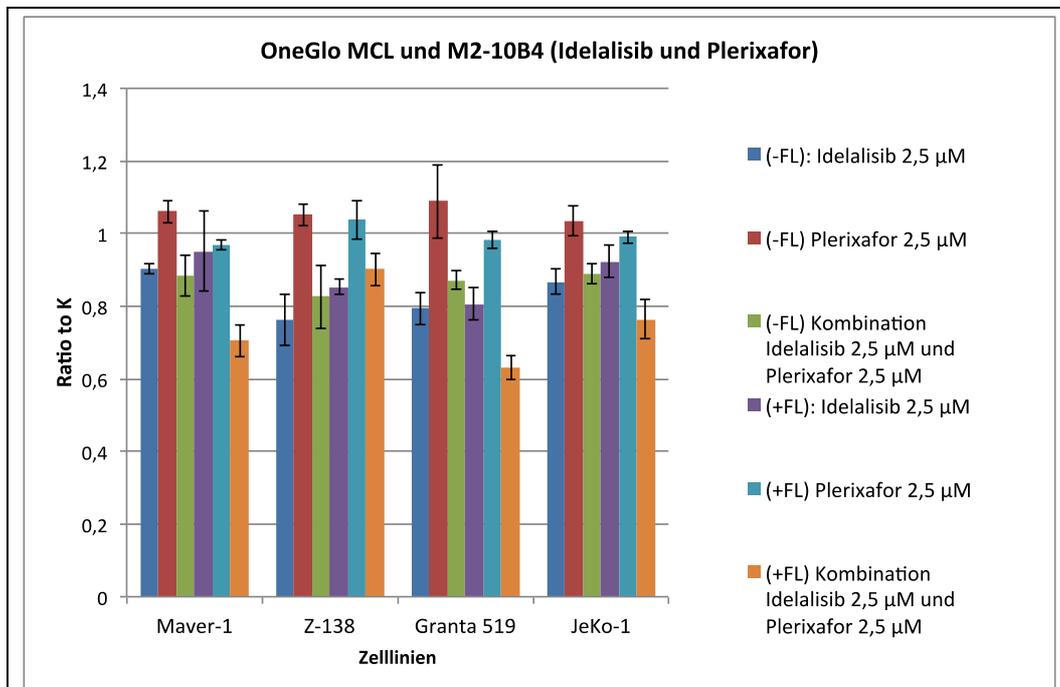


Abb. 39: One-Glo Idelalisib und Plerixafor Kombination: alle MCL-Zelllinien wurden mit und ohne M2-10B4 als Feederlayer nach 48 Stunden Behandlung analysiert. Dargestellt ist das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle für die Single-Inhibitoren und die Kombination.

	Maver-1 (-FL)	Maver-1 (+FL)	Z-138 (-FL)	Z-138 (+FL)	Granta 519 (-FL)	Granta 519 (+FL)	JeKo-1 (-FL)	JeKo-1 (+FL)
K	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,3125µM / 0,3125µM	0,032	0,077	0,187	-0,115	0,034	0,085	-0,021	-0,091
0,625µM / 0,625µM	0,053	0,097	0,136	-0,141	0,099	0,042	0,037	0,047
1,25µM / 1,25µM	0,033	0,163	0,208	-0,094	0,051	0,163	0,019	0,050
2,5µM / 2,5µM	0,073	0,216	-0,025	-0,017	-0,007	0,163	0,007	0,150
5µM / 5µM	0,011	0,139	0,077	-0,031	0,034	0,131	-0,006	0,129

Tab. 5: Fractional Products der One-Glo Versuche mit der Kombination aus Idelalisib und Plerixafor. Es sind die Ergebnisse für die MCL-Linien Maver-1, Z-138, Granta 519 und JeKo-1 in An- und Abwesenheit des FL M2-10B4 abgebildet.

Dargestellt ist das berechnete FP, die Felder sind für antagonistische Werte rot, für additive Werte gelb und für synergistische Werte grün eingefärbt.

4.2.5.3. Copanlisib und Plerixafor

Die Analyse des zweiten PI3K-Inhibitors Copanlisib mit dem CXCR4-Inhibitor Plerixafor wurde im One-Glo Assay mit den Zelllinien Maver-1, Z-138, Granta 519 und JeKo-1 sowie dem Feederlayer M2-10B4 nach 48 Stunden Inkubation durchgeführt. Copanlisib wurde in Konzentrationen von 0,0625 μM bis 1 μM verwendet, Plerixafor wie schon bei den anderen Versuchen im Bereich von 0,31 μM bis 5 μM .

Copanlisib als Single-Inhibitor zeigte wie unter 4.1.4.2. gezeigt ein gutes Ansprechen, am deutlichsten in den Linien Maver-1 und JeKo-1. In der Kombination zeigte sich in allen untersuchten Zelllinien sowohl in der Fraktion ohne Feederlayer als auch in der Ko-Kultur kein relevanter Unterschied zur Single-Behandlung mit Copanlisib. Durch das geringe Ansprechen auf den Inhibitor Plerixafor berechnete sich dennoch ein additives Fractional Product für alle MCL-Linien in den meisten Konzentrationen.

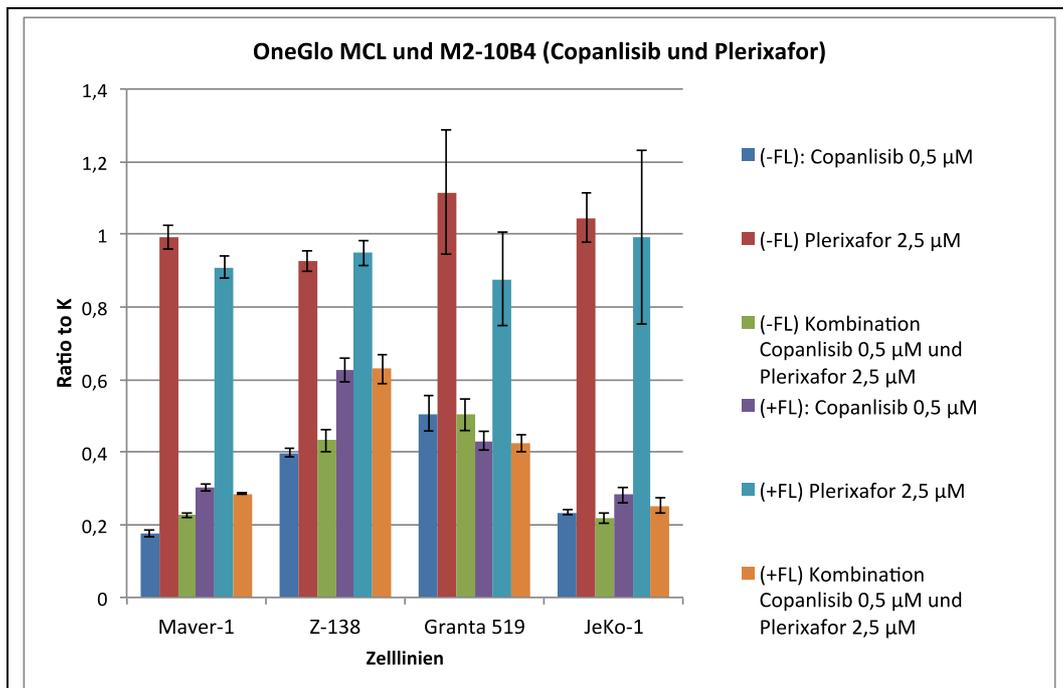


Abb. 40: One-Glo Copanlisib und Plerixafor Kombination: alle MCL-Zelllinien wurden mit und ohne M2-10B4 als Feederlayer nach 48 Stunden Behandlung analysiert. Dargestellt ist das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle für die Single-Inhibitoren und die Kombination.

4.2.6. Plerixafor und Cytarabin

Das Zytostatikum Cytarabin wurde mit dem CXCR4-Inhibitor Plerixafor im One-Glo Luciferase Assay mit den MCL-Linien Maver-1, Z-138, Granta 519 und JeKo-1 sowie dem Feederlayer M2-10B4 nach 48 Stunden Inkubation analysiert. Cytarabin wurde

dabei in Konzentrationen von 0,0625 μM bis 1 μM , Plerixafor wiederum in 0,31 μM bis 5 μM verwendet.

Für die MCL-Zellen in Reinkultur zeigte sich kein Unterschied zwischen der Single-Therapie mit Cytarabin und der Kombination mit Plerixafor. Bei den Zellen in Ko-Kultur mit dem Feederlayer konnte eine geringe Wirkungssteigerung in der Kombination bei den Zelllinien Maver-1, Z-138 und JeKo-1 beobachtet werden. Dies zeigte auch die Berechnung der Fractional Products für diese Zellen, welche im Bereich einer additiven Wirkung lagen. In der Linie Granta 519 trat für die verwendeten niedrigen Cytarabin-Konzentrationen, in denen die Zelllinie nur ein geringes Ansprechen zeigte, ein Antagonismus auf. Bei einer Wiederholung der Analyse mit einer höheren Cytarabinkonzentration von 0,41 μM bis 6,6 μM konnte auch in dieser Zelllinie eine Wirkungsverstärkung durch die Kombinationstherapie und ein additives bis synergistisches Fractional Product beobachtet werden.

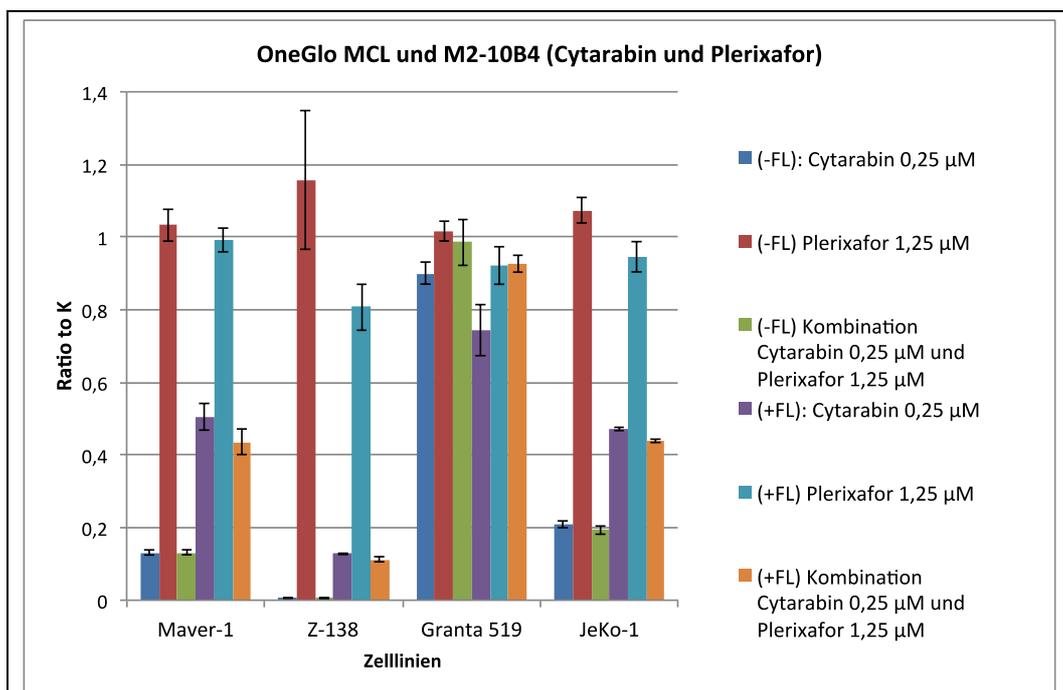


Abb. 41: One-Glo Cytarabin und Plerixafor Kombination: alle MCL-Zelllinien wurden mit und ohne M2-10B4 als Feederlayer nach 48 Stunden Behandlung analysiert. Dargestellt ist das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle für die Single-Inhibitoren und die Kombination.

4.3. PCR und Sequenzierung der HRV-1-DNA

Nach Durchführung der PCR der HRV-1 DNA für alle verwendeten MCL-Zelllinien und Erhalt der Sequenzierungsergebnisse wurde die Sequenz auf die typischen Mutationen geprüft.

Dabei zeigten sich in allen Zellen die erwarteten Mutationen an den entsprechenden Stellen im Genom, so dass die Identität aller Zelllinien bestätigt werden konnte [104] [Hutter, G. et al., unpublizierte Daten].

Zelllinie	Position	Mutation
Maver-1	16189	T – C
	16222	C – T
	16277	C – T
Z-138	keine Mutation nachgewiesen	
Granta 519	16223	T – C
	16311	T – C
JeKo-1	16208	T – C
	16222	C – T
	16324	T – C
Mino	16050	A – G
	16297	T – C

Tab. 6: Ergebnisse der HRV-1-DNA PCR und Sequenzierung. Dargestellt sind die Positionen der nachgewiesenen Mutationen in der HRV-DNA für die verschiedenen MCL-Zelllinien.

5. Diskussion

Das Mantelzelllymphom ist ein seltener Vertreter aus der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome [1]. Es befindet sich bei Diagnosestellung häufig bereits in einem fortgeschrittenen Stadium [3] und weist trotz bedeutender Fortschritte in den letzten Jahren [5] insgesamt eine sehr schlechte Prognose auf und ist nicht heilbar [6]. Durch rege Forschungstätigkeit ist in letzter Zeit das Verständnis der Pathologie des Mantelzelllymphoms stetig gewachsen. Vor allem wurden viele molekulare Mechanismen in verschiedenen Signalwegen beschrieben, die entscheidend zur Pathogenese des Lymphoms beitragen. Dies eröffnet nun die Möglichkeit gezielt molekulare Substanzen zur Therapie einzusetzen [9]. Ein wichtiger Baustein der molekularen Pathogenese ist die vermehrte Expression des zellzyklusregulierenden Proteins Cyclin D1, der meist die Translokation t(11;14)(q13;q23) zu Grunde liegt. Diese Überexpression vermittelt über eine Signalkaskade, die unter anderem die Kinasen CDK4 und CDK6 sowie das Retinoblastomprotein beinhaltet, die Aktivierung des Zellzyklus von der G₁-Phase hin zur S-Phase [17-19]. Auch dem PI3K/AKT/mTOR Signalweg wird eine wichtige Rolle für die Pathogenese, die Proliferation und das Überleben der Tumorzellen zugesprochen [19]. Von ebenso großer Bedeutung ist der gesamte dem B-Zell-Rezeptor nachgeschaltete Signalweg, welcher ebenfalls die Zellvermehrung und das Überleben der Lymphomzellen fördert und gleichzeitig wiederum den PI3K/AKT/mTOR Signalweg aktiviert [30, 36, 37]. Diese beiden Signalwege spielen auch eine entscheidende Rolle bei der Beeinflussung des Tumors durch das umgebende Microenvironment, welches auch beim Mantelzelllymphom eine wichtige Rolle in der Pathogenese und der Resistenzentstehung spielt [34, 46]. Bereits bei der Tumorentstehung stellt der Zell-Zell-Kontakt sowie die Stimulation der Lymphomzellen über verschiedene Zytokine einen wichtigen Baustein dar [47]. Des Weiteren induziert der Kontakt zu den Zellen des Microenvironments in vielen Fällen eine primäre, zellvermittelte Resistenz gegen verschiedene Therapeutika (CAM-DR) [45, 46]. Aktuell zugelassene Substanzen für die molekular gezielte Therapie des MCL sind das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Ibrutinib, sowie die Therapeutika Bortezomib, Temsirolimus und Lenalidomid [80, 121]. Es sind unzählige weitere Substanzen in der technischen Entwicklung oder in der klinischen Studienphase, wovon einige im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht wurden.

5.1. Vergleich der Feederlayer

Um den Einfluss des Microenvironments auf die Lymphomzellen sowie die Wirkung der verwendeten Medikamente abzubilden, wurde der Großteil der Versuche dieser Arbeit parallel mit Lymphomzellen in Reinkultur sowie in Ko-Kultur mit dem Feederlayer M2-10B4 durchgeführt. Diese stromale Zelllinie ist murinen Ursprungs [100] und die Ko-Kultur ist ein etabliertes Verfahren zur Simulation des natürlichen Tumor-Microenvironments, welche bereits in vielen Studien Verwendung fand [34, 44-47]. Eine weitere stromale Zelllinie zur Simulation der stromalen Umgebung ist die humane Feederlayer-Linie HS-5 [102, 103], welche ebenso als Ko-Kultur von malignen Zellen bereits in zahlreichen Studien eingesetzt wurde [48, 52, 122]. Um eine Vergleichbarkeit der Ko-Kultur der MCL-Zellen mit diesen beiden Feederlayer-Zelllinien zu evaluieren, wurde das One-Glo Luciferase Assay mit den Inhibitoren Abemaciclib und Ibrutinib sowie deren Kombination mit beiden FL-Zelllinien unter identischen Bedingungen durchgeführt. Dabei zeigte sich insgesamt in allen Zelllinien ein ähnliches Verhalten mit den unterschiedlichen Feederlayern. Lediglich die Zelllinie Granta 519 zeigte in der Kombinationstherapie mit der murinen Zelllinie einen Antagonismus und mit der humanen Zelllinie einen additiven bis synergistischen Effekt. Dieser Unterschied war dabei aber nicht durchgehend signifikant. Die Linie Maver-1 zeigte in der Kombinationstherapie zwar mit beiden Feederlayern einen Effekt in die gleiche Richtung, jedoch in signifikant unterschiedlicher Stärke. In den übrigen Behandlungsgruppen und Zelllinien wurde kein signifikanter Unterschied der MCL-Proliferation, gemessen durch die Luciferaseaktivität, zwischen der Ko-Kultur mit HS-5 und der mit M2-10B4 festgestellt. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen von Simon-Gabriel et al., welche bei CLL-Zellen keine Unterschiede in der Ko-Kultur mit den beiden auch in dieser Arbeit verwendeten FL-Zelllinien feststellten [123]. Auch eine Publikation von Medina et al. hat gezeigt, dass sowohl murine Stromazellen als auch humane Knochenmarkszellen MCL-Zellen in ihrer Proliferation fördern und deren Apoptose vermindern können [50]. Der Schutz von CLL- oder MCL-Zellen vor spontaner oder durch zytotoxische Substanzen ausgelöster Apoptose durch die Feederlayer HS-5 oder M2-10B4 wurde auch von verschiedenen anderen Autoren beobachtet [45, 46, 48, 52, 122, 123]. Ebenso konnte ein fördernder Effekt auf die Aktivität und die Proliferation von MCL- und CLL-Zellen in Ko-Kultur zu humanen oder murinen Feederlayern von verschiedenen Autoren beobachtet werden [50, 100, 124]. Zusammengefasst zeigen die identischen Experimente mit dem murinen und dem

humanen Feederlayer vergleichbare Ergebnisse und meist nur geringe Abweichungen. Die Ergebnisse mit dem FL M2-10B4 sind somit weitgehend auch auf ein Microenvironment durch humane Zellen übertragbar.

5.2. Single-Therapie

5.2.1. Cytarabin

Das Zytostatikum Cytarabin zeigte in den Proliferationsversuchen mit den Zelllinien JeKo-1, Z-138 und Mino eine zeitlich ansteigende Wirkung (vgl. Abb. 24). In den One-Glo Luciferase Analysen konnte eine konzentrationsabhängige Wirkung von Cytarabin beobachtet werden (vgl. Abb. 26). Die Auswirkung der Therapie, dargestellt durch das Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle, war dabei im Luciferase Assay deutlich ausgeprägter. Die insgesamt stärkste Wirkung zeigte Cytarabin in der Zelllinie Z-138. Diese Zelllinie zeigte von allen verwendeten Linien die stärkste Proliferation in der Kultur, was die ausgeprägte Wirkung des Zytostatikums erklärt, da diese Gruppe von Medikamenten besonders stark in sich schnell teilenden Zellen wirkt. Auch Jacobson et al. beobachteten die niedrigste IC50 von Cytarabin für die Linie Z-138 [125]. In beiden Versuchen zeigte sich eine unterschiedlich ausgeprägte Wirkung in den verschiedenen MCL-Fraktionen bezogen auf den Feederlayer. Cytarabin hatte im Luciferase-Assay eine deutlich stärkere Wirkung auf die MCL-Zellen in Reinkultur als auf die in der FL-Ko-Kultur. Dies zeigte sich auch in den Proliferationsdaten, die Hemmung durch Cytarabin war in der Reinkultur deutlich ausgeprägter als in den eingenisteten Zellen. Auch in den beiden Fraktionen der Ko-Kultur trat ein deutlicher Unterschied auf. Die Zellen des Überstandes wurden in einer ähnlichen Größenordnung wie die Zellen der Reinkultur inhibiert, während die eingenisteten Zellen weniger Ansprechen zeigten. Bei der Analyse der Viabilität und der korrespondierenden Apoptoserate nach 48 Stunden zeigte sich ein identisches Muster. In den MCL-Zellen der Reinkultur sowie im Überstand der Ko-Kultur trat eine deutliche Abnahme der Viabilität mit der entsprechend ausgeprägten Zunahme der apoptotischen Zellen auf. In den eingenisteten Zellen der Ko-Kultur war die Wirkung hingegen deutlich geringer ausgeprägt, was auf einen starken protektiven Effekt des Feederlayers auf diese Zellfraktion schließen lässt (vgl. Abb. 25 und 26). Die Wirkung von Cytarabin oder anderen Zytostatika auf Mantelzelllymphom-Zelllinien allein und in Ko-Kultur mit einem Feederlayer wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben. Dabei wurde auch der protektive Effekt

durch den Feederlayer beobachtet. Die Tumorzellen wurden dabei von den umgebenden Stromazellen vor der Wirkung des Therapeutikums geschützt, was auch als CAM-DR (Cell-Adhesion-Mediated-Drug-Resistance) bezeichnet wird. So zeigten Kim et al. für die MCL-Linie JeKo-1 ebenfalls eine geringer ausgeprägte Apoptose unter Cytarabintherapie in den MCL-Zellen der M2-10B4-Ko-Kultur [46]. Für die Zelllinien Mino und SP-53 konnte von Kurtova et al. ebenfalls ein protektiver Effekt durch den Feederlayer auf die eingenisteten Zellen in der Analyse der Viabilität und der Apoptose unter Fludarabin oder 4-Hydroperoxycyclophosphamid nachgewiesen werden [45]. Medina et al. zeigten für primäre MCL-Zellen unter Therapie mit Doxorubicin oder Fludarabin einen protektiven Effekt der Ko-Kultur sowohl auf den Überstand als auch auf die eingenisteten Zellen, wobei auch hier der Effekt bei den eingenisteten Zellen signifikant stärker ausgeprägt war [50]. Somit konnten durch die Experimente mit Cytarabin zum einen die Ergebnisse aus anderen Arbeiten sowohl in Bezug auf die Wirkung des Zytostatikums als auch auf den protektiven Effekt der FL-Ko-Kultur nachvollzogen und in den verwendeten MCL-Linien bestätigt werden. Zum anderen konnte auch die Zuverlässigkeit der Methoden im Labor, wie der Proliferations- und Viabilitätsmessung, der Apoptoseanalyse und des Luciferase-Assay verifiziert werden. Dies ermöglicht eine bessere Interpretation der Ergebnisse mit noch weniger untersuchten Inhibitoren oder Medikamenten-Kombinationen.

5.2.2. Abemaciclib

Für die Therapie mit dem CDK4/6-Inhibitor Abemaciclib zeigte sich in den Proliferationsversuchen eine zeitlich ansteigende Wirkung von 24 Stunden über 48 Stunden auf 72 Stunden in den Zelllinien Maver-1, Z-138, Granta 519 und JeKo-1 (vgl. Abb. 6). Im One-Glo Luciferase Assay konnte eine konzentrationsabhängig ansteigende Wirkung nachgewiesen werden (vgl. Abb. 7). Dabei waren die Ergebnisse für die verwendeten MCL-Linien in beiden Methoden in einer ähnlichen Größenordnung nachzuweisen, einzig in den Zellen der Granta 519 war der Effekt im One-Glo Assay deutlich geringer ausgeprägt. Die stärkste Wirkung zeigte der Inhibitor sowohl in den Proliferationsversuchen als auch im One-Glo Luciferase Assay in der Linie JeKo-1. Diese dosis- und zeitabhängige Hemmung der Proliferation durch Abemaciclib wurde von anderen Autoren in östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomzellen [64], Adenokarzinomzellen des Ösophagus [126] oder kolorektalen Zellen [61] beobachtet. Die Analyse der Apoptoserate unter Abemaciclib-Therapie ergab in den untersuchten Zelllinien Z-138 und JeKo-1 nur eine gering ausgeprägte Steigerung im Vergleich zur

Kontrolle (vgl. Abb. 8). Die Abnahme des Anteils der viablen Zellen bewegte sich dabei gleichsinnig zur Zunahme der Apoptoserate und zeigte keinen signifikanten Unterschied zu dieser. Torres-Guzman et al. beschrieben in östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomzellen eine Zunahme der Apoptoserate vor allem unter mehrtägiger Abemaciclibtherapie [64], ebenso konnten Kosovec et al. eine Zunahme der Apoptose in ösophagealen Adenokarzinomzellen nachweisen [126]. Bei beiden war dabei allerdings die Zunahme der Apoptose deutlich ausgeprägter als in den MCL-Linien im Rahmen dieser Arbeit, wenngleich deutlich höhere Abemaciclib-Konzentrationen verwendet wurden.

In allen untersuchten Zelllinien konnte in den Proliferationsversuchen zumindest zu einem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen im Überstand und den eingenisteten Zellen in der FL-Ko-Kultur gezeigt werden. Bei den Linien Maver-1 und JeKo-1 zeigte sich auch zwischen den Zellen der Reinkultur und den eingenisteten Zellen ein signifikanter Unterschied. Dabei sprachen die in den Feederlayer eingenisteten Zellen deutlich weniger auf die Abemaciclibtherapie an als die anderen Fraktionen. Dieser Unterschied zwischen den Fraktionen zeigte sich ebenfalls in der durchflusszytometrischen Apoptoseuntersuchung. Der protektive Effekt des FL, eine CAM-DR (Cell-Adhesion-Mediated-Drug-Resistance) bei den eingenisteten MCL-Zellen hervorzurufen, wurde von verschiedenen Autoren, wie weiter oben angeführt, unter zytostatischer Therapie in MCL-Zellen beobachtet [45, 46, 50]. Medina et al. zeigten darüber hinaus in primären MCL-Zellen einen protektiven Effekt der FL-Ko-Kultur unter Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib. Dabei zeigte sich sowohl ein Unterschied zwischen MCL-Zellen in Reinkultur und den eingenisteten Zellen als auch zwischen den Zellen des Überstandes und den eingenisteten Zellen der Ko-Kultur [50]. Die CAM-DR, respektive der protektive Effekt des Feederlayers, tritt, wie aus den Daten dieser Arbeit ersichtlich ist, auch unter einer in-vitro Therapie mit Abemaciclib auf.

Als CDK4/6-Inhibitor ruft Abemaciclib einen dosisabhängigen Zellzyklusarrest in der G1-Phase hervor. Das wurde von verschiedenen Autoren sowie von Luca Fischer in seiner Dissertation, deren Experimente im gleichen Labor wie die dieser Arbeit durchgeführt worden waren, gezeigt [61, 64, 109, 127, 128]. Um die Wirkung des Inhibitors auf die Regulierung des Zellzyklus und weitere Signalwege zu untersuchen, wurden die entsprechenden Proteine nach Auftrennung der Fraktionen mittels des MACS-Verfahrens im Western Blot nachgewiesen. Dabei zeigte sich die Wirkung des Inhibitors auf seine Zielstrukturen durch eine starke Abnahme der aktivierten Form von

Rb, welches von dem Komplex aus CDK4/6 und Cyclin D1 phosphoryliert wird. Die Abnahme der phosphorylierten Form trat sowohl mit als auch ohne Feederlayer in allen Fraktionen stark ausgeprägt auf. Auch die nicht phosphorylierte Form Rb wurde unter Abemaciclib-Therapie in allen Fraktionen vermindert exprimiert, der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle war aber geringer. Gelbert et al. beobachteten in ihren Versuchen mit der MCL-Zelllinie JeKo-1 ebenfalls, dass unter der Abemaciclib-Behandlung der G1-Arrest mit einer deutlichen Verminderung von ph-Rb einherging [61]. Diese Beobachtung wurde von Torres-Guzman et al. für die Therapie von Mammakarzinomzellen ebenso bestätigt [64]. Sathe et al. konnten in Blasenkarzinomzellen eine dosisabhängige Verminderung beider Formen, sowohl von Rb als auch von ph-Rb nachweisen [128]. Die Ergebnisse der Analyse von Rb und ph-Rb in dieser Arbeit legen die Vermutung nahe, dass der verminderte Effekt von Abemaciclib auf die eingenisteten Zellen nicht durch eine geringere Inhibition von CDK4/6 in dieser Fraktion zu Stande kam. Die verwendeten Konzentrationen wurden auch von weiteren Autoren als deutlich ausreichend für eine suffiziente Inhibition der Kinasen beschrieben [127]. Offen blieb dabei die Frage, ob der Zellzyklusarrest in der G1-Phase in der Fraktion der eingenisteten Zellen trotz adäquater Rb-Inhibition vermindert ausgeprägt war. Dies müsste in weiteren Untersuchungen beispielsweise mittels durchflusszytometrischer Zellzyklusanalyse nach Trennung von MCL- und FL-Zellen ermittelt werden.

Auch in der Analyse der Expression von CDK2 und cMyc in den untersuchten Zelllinien Z-138 und JeKo-1 ließ sich kein Unterschied zwischen den Fraktionen nachweisen, der den protektiven Effekt auf die eingenisteten Zellen erklären konnte.

Einen möglichen Mechanismus des protektiven Effektes durch den Feederlayer zeigte die Analyse des B-Zell-Rezeptor-Signalfades sowie der PI3K-Signalkaskade, welche durch die Interaktion der MCL-Zellen mit dem FL aktiviert wurden [34, 44, 48].

In der Analyse der Expression der beiden phosphorylierten Formen von AKT in der Zelllinie Z-138 zeigte sich eine starke Hemmung unter Therapie mit Abemaciclib in den Zellen der Reinkultur. Die Zellen in Kontakt zum Feederlayer zeigten hingegen sowohl im Überstand als auch in den eingenisteten Zellen nur eine gering ausgeprägte Hemmung und teils sogar eine starke Überexpression von ph-AKT unter der Abemaciclib-Behandlung. Die Grundform AKT zeigte in den eingenisteten Zellen keine signifikante Änderung der Expression, während sowohl in den Zellen der Reinkultur als auch im Überstand eine deutlich geringere Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen wurde. Die Expression der aktiven Formen wies somit ein ähnliches

Muster wie die Ergebnisse der Proliferationsversuche auf und könnte einen Teil des protektiven Effektes der Feederlayer-Ko-Kultur erklären. In den Zellen der JeKo-1 konnte ein ähnliches Muster beobachtet werden. Bei einer nur gering verminderten Expression der beiden Formen von ph-AKT in der Reinkultur wiesen die Zellen in beiden Fraktionen der Ko-Kultur eine Überexpression dieser Proteine auf. Die Grundform AKT zeigte keinen Unterschied zwischen den Fraktionen. Auch diese Daten wiesen somit auf einen Einfluss des Feederlayer über die Aktivierung von AKT hin. Bei der Analyse von Raptor und der aktiven Form ph-Raptor als Teil des mTORC1-Komplexes zeigte sich in der Zelllinie Z-138 für die Messung nach 4 Stunden eine deutliche Expressionsverminderung in den Zellen der Reinkultur sowie im Überstand, während sich in den eingenisteten Zellen eine Überexpression nachweisen lies. Auch dieses Aktivierungsmuster wies auf eine Rolle des AKT-mTOR-Signalweges für den protektiven Effekt der FL-Ko-Kultur hin. Die Auswertung der Expression der p44/42-MAPK als Teil eines weiteren dem B-Zell-Rezeptor nachgeordneten Signalpfades in der Zelllinie Z-138 zeigte sowohl in den Zellen der Reinkultur als auch des Überstandes der Ko-Kultur eine deutliche Reduktion unter der Abemaciclib-Behandlung. In den eingenisteten Zellen der Ko-Kultur zeigte sich dagegen kaum eine Verringerung bis hin zu einer Steigerung der Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dieses Muster der verschiedenen Fraktionen entsprach ebenfalls den Ergebnissen aus den Proliferationsversuchen und könnte somit einen weiteren Teil der Beeinflussung durch den Feederlayer über eine Aktivierung des B-Zell-Rezeptors erklären. Die vermehrte Transkription und Expression von AKT und p44/42-MAPK beziehungsweise die gesteigerte Aktivierung zu ph-AKT und ph-p44/42-MAPK wurde von verschiedenen Autoren für den Kontakt von Lymphomzellen mit dem Microenvironment beschrieben. Mehrere Publikationen zeigten für CLL-Zellen in Kontakt mit einem Feederlayer eine deutliche Steigerung von ph-AKT und AKT beziehungsweise ph-p44/42-MAPK und p44/42-MAPK [76, 83, 129]. Auch für MCL-Zelllinien sowie primäre Zellen konnte eine Aktivierung von AKT sowie p44/42-MAPK in Ko-Kultur zum Feederlayer gezeigt werden [46, 124]. Dass die Interaktion über den B-Zell-Rezeptor hierbei eine entscheidende Rolle spielt, zeigten Bernard et al. sowie Quiroga et al. indem sie die Aktivierung von AKT sowie der p44/42-MAPK durch Stimulation des BCR mit IgM auslösen konnten [34, 49]. Zhao et al. konnten in MCL-Zelllinien und primären MCL-Zellen eine Aktivierung zu ph-AKT und ph-p44/42-MAPK in der FL-Ko-Kultur durch Reduktion der CD79-Expression vermindern [124]. Dies verdeutlicht ebenso die entscheidende Bedeutung des B-Zell-Rezeptors für die Interaktion der Lymphomzellen

mit dem Microenvironment und für die Entstehung des protektiven Effektes. Darüber hinaus wurde eine vermehrte Expression von ph-Akt und ph-p44/42-MAPK auch nach Stimulation von Lymphomzellen mit CXCL12 oder CXCL13 beobachtet. Auch die Interaktion über den Rezeptor CXCR4 scheint somit eine wichtige Rolle zu spielen [45, 76]. Die wichtige Rolle von ph-Raptor im mTORC1-Komplex für die Proliferation von MCL-Zellen zeigten Zhao et al., was die Bedeutung der veränderten Expression in Kontakt mit dem Feederlayer unterstreicht [124].

5.2.3. Ibrutinib

Um den in der Therapie mit Cytarabin und Abemaciclib beobachteten protektiven Effekt im Sinne einer CAM-DR zu überwinden wurden verschiedene weitere Therapeutika untersucht, die in den Signalweg des B-Zell-Rezeptors oder anderer Rezeptoren, die für die Interaktion der MCL-Zellen mit dem Feederlayer eine Rolle spielen, eingreifen.

Der BTK-Inhibitor Ibrutinib zeigte in den Ergebnissen der Proliferationsversuche ein grundlegend anderes Bild als Abemaciclib oder Cytarabin. Die Zellzahl in den MCL-Linien in Reinkultur zeigte meist eine gering ausgeprägte Reduktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Zellen des Überstandes der Ko-Kultur, die unter den anderen Therapeutika meist ein ähnliches Verhalten wie die der Reinkultur aufwiesen, zeigten auf die Ibrutinib-Therapie in den meisten Zelllinien keine Reduktion der Zellzahl. Die eingenisteten Zellen wiesen hingegen, außer in der Linie Granta 519, von allen Kompartimenten die stärkste Inhibition der Proliferation durch die Ibrutinibtherapie auf. Dabei zeigte sich für die Zelllinien Maver-1, Z-138, JeKo-1 und Mino eine Verminderung des Anteils der in den Feederlayer eingenisteten Zellen. Dieses Wirkungsmuster hat wohl zwei Hauptgründe. Zum einen wirkt Ibrutinib als BTK-Inhibitor auf den B-Zell-Rezeptor-Signalpfad, der vor allem in den eingenisteten Zellen der Feederlayer-Ko-Kultur aktiviert wird, was die starke Wirkung in diesem Kompartiment erklären könnte [34, 124, 129]. Zum anderen verhindert Ibrutinib wirkungsvoll die Einnistung der MCL-Zellen in den Feederlayer (vgl. Abb. 16), weshalb sich in den Proliferationsversuchen in diesem Kompartiment eine stärkere Verringerung der Zellzahl zeigte. Bernard et al. konnten zeigen, dass die Adhäsion von MCL-Zellen an den Feederlayer abhängig von der Stimulation des B-Zell-Rezeptors ist und durch die Behandlung mit Ibrutinib herabgesetzt wird [34]. Die verminderte Einnistung beziehungsweise Mobilisierung der Zellen aus der Umgebung des Microenvironments konnte durch verschiedene Autoren mit MCL-Zellen [30, 124,

130], CLL-Zellen [76] sowie in MCL-Patienten [77, 130] ebenso beobachtet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten die stärkste Proliferationshemmung in der Zelllinie JeKo-1, was mit den Daten von Jacobson et al. übereinstimmt, die für diese Linie die niedrigste IC50 von allen verwendeten MCL-Zellen bestimmt hatten [125]. Auch Bernard et al. konnten für JeKo-1 eine Sensibilität unter 5 μM beobachten [34], wohingegen Cinar et al. die IC50 im Bereich von 10 μM bis 25 μM sahen [131] und Chiron et al. gar von einer Ibrutinib-resistenten Zelllinie sprachen [132]. Für die Analyse der Proliferation mit dem One-Glo-Luciferase-Assay ergaben sich auf den ersten Blick widersprüchliche Ergebnisse. Für alle untersuchten Zelllinien zeigte die Ibrutinib-Behandlung anders als in den Vi-Cell-Analysen eine stärkere Wirkung in den Zellen ohne FL-Ko-Kultur. Das lag daran, dass im One-Glo die Fraktionen aus der FL-Ko-Kultur (ÜS und EZ) nicht getrennt betrachtet werden konnten und Ibrutinib in den anderen Ansätzen lediglich in den eingenisteten Zellen eine stärkere Wirkung gezeigt hatte, im Überstand aber ein schwächeres Ansprechen als in der Reinkultur aufgewiesen hatte. Dies überwog wohl die eingenisteten Zellen in diesem Ansatz, weshalb eine geringere Inhibition in der Ko-Kultur gemessen wurde.

Eine ähnlich uneinheitliche Datenlage wie für die Proliferationshemmung herrscht bezüglich der Apoptoseinduktion durch Ibrutinib *in vitro*. In den Ergebnissen dieser Arbeit ist ersichtlich, dass sich in den untersuchten Zelllinien für die gewählte Konzentration keine relevante Veränderung der Apoptoserate sowie der korrespondierenden Viabilität zeigte. Chiron et al., die mit noch etwas geringeren Konzentrationen gearbeitet hatten, konnten ebenfalls keine zytotoxischen Effekte durch Ibrutinib nachweisen [132]. Herman et al. hingegen beobachteten eine Apoptoseinduktion in CLL-Zellen [37], auch in primären MCL-Zellen konnte eine gesteigerte Apoptoserate nachgewiesen werden [34]. Für einige MCL-Zelllinien konnte von Zhao et al. sowie von Cinar et al. ebenfalls eine Steigerung der Apoptose beobachtet werden, wobei dabei teils deutlich höhere Ibrutinib-Konzentrationen als in dieser Arbeit verwendet wurden [124, 131].

Als BTK-Inhibitor verhindert Ibrutinib die Phosphorylierung von BTK zu $\text{ph-BTK(Tyr}^{223})$ und hemmt so den weiteren B-Zell-Rezeptor-Signalweg, wie von verschiedenen Autoren für unterschiedliche maligne Zellen bereits gezeigt werden konnte [74-76, 131, 132]. Dabei waren bereits deutlich niedrigere Konzentrationen als für eine Inhibition der Proliferation ausreichend [34]. In den untersuchten Zellen dieser Arbeit konnte eine nahezu vollständige Verminderung der aktiven Form ph-BTK durch die Ibrutinib-Behandlung nachgewiesen werden. Dabei bestand kein Unterschied

zwischen den einzelnen Fraktionen, die molekular gezielte Wirkung von Ibrutinib hatte also auch in den Zellen der FL-Ko-Kultur ihre volle Ausprägung. Die Wirkung in allen Fraktionen wurde auch von Bernard et al. sowie Zhao et al. nachgewiesen [34, 124]. Dies zeigt, dass Ibrutinib in der Lage sein könnte, den protektiven Effekt des Feederlayers zu stören, da es in den eingemisteten Zellen wirkt und einen Teil des B-Zell-Rezeptor-Signalpfades inhibiert. Die Reduktion des protektiven Effektes auf die Lymphomzellen konnte folglich, sowohl was die spontane Apoptose als auch die Wirkung zytotoxischer Medikamente anbelangt, von mehreren Autoren bestätigt werden [30, 34, 37, 123, 124, 130].

Die im weiteren Verlauf des Signalweges gelegenen Kinasen MEK1/2 sowie p44/42-MAPK zeigen im Gegensatz zur BTK wieder einen Unterschied zwischen den Fraktionen und auch zwischen den untersuchten Zelllinien. Die Zelllinie JeKo-1 zeigte für die untersuchte Konzentration von 5 μ M Ibrutinib keine Verminderung der aktivierten Form ph-p44/42 MAPK im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch Bernard et al. beobachteten bei dieser Konzentration noch keine Reduktion der ph-p44/42-MAPK [34]. Die Zelllinie Z-138 zeigte hingegen für diese Konzentration in der Reinkultur sowohl für die ph-MEK1/2 als auch die ph-p44/42-MAPK eine deutlich reduzierte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei den beiden Fraktionen der Ko-Kultur trat ein deutlicher Unterschied zu Tage. Während bei den eingemisteten Zellen sowohl die Expression von ph-MEK1/2 als auch von ph-p44/42-MAPK signifikant vermindert wurde, trat in den Zellen des Überstandes eine Überexpression von ph-MEK1/2 und eine diskret vermehrte bis gleichbleibende Expression der ph-p44/42-MAPK auf. Das Ansprechen des MAP-Kinase-Signalweges auf die Behandlung mit Ibrutinib wurde von verschiedenen Autoren beschrieben. So konnten Zhao et al. und Honigberg et al. in MCL-Zellen eine Abnahme der ph-p44/42-MAPK feststellen, de Rooij et al. sowie Herman et al. zeigten diese in CLL-Zellen [74, 76, 81, 124]. Im Gegensatz dazu konnten Bernard et al. wie erwähnt keine Reduktion der ph-p44/42-MAPK bei der verwendeten Konzentration nachweisen [34]. Ähnlich zu Beobachtungen in dieser Arbeit, dass vor allem in den Zellen des Überstandes die Aktivierung von MEK1/2 und p44/42-MAPK erfolgte, zeigten Woyach et al. in den in die Blutbahn ausgeschwemmten CLL-Zellen von Ibrutinib-behandelten Patienten, die eine verlängerte Phase der Lymphozytose aufgewiesen hatten, eine starke Aktivierung der beiden Kinasen trotz suffizienter BTK-Inhibition [77]. Die Expression und Aktivierung von AKT zeigte ebenfalls einen deutlichen Unterschied zwischen den untersuchten Zelllinien. In den Zellen der Z-138 trat in beiden Formen von ph-AKT

eine signifikante Reduktion unter der Ibrutinib-Behandlung sowohl in der Reinkultur als auch in beiden Fraktionen der Ko-Kultur auf. Die Wirkung war dabei erneut in der Reinkultur und den eingenisteten Zellen etwas stärker als in den Zellen des Überstandes. Die Zellen der Linie JeKo-1 wiesen hingegen meist eine nur geringe Verminderung der beiden Formen von ph-AKT in der Reinkultur sowie dem Überstand der Ko-Kultur auf. Die eingenisteten Zellen zeigten sogar eine sehr deutliche Überexpression von ph-AKT im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch die Literatur nennt bei der Analyse von AKT divergente Ergebnisse. Während mehrere Autoren wie in der Linie Z-138 eine deutliche Reduktion von ph-AKT sowohl in CLL-Zellen [37, 76] als auch in MCL-Zellen zeigen konnten [124, 132], beobachteten Woyach et al. in den erwähnten CLL-Zellen Ibrutinib-behandelter Patienten eine starke Expression von ph-AKT [77]. Zhao et al. zeigten in Ibrutinib-resistenten MCL-Zelllinien in der Ko-Kultur eine deutliche Aktivität von AKT trotz Ibrutinib-Therapie [124]. Auch Chiron et al. beobachtete in den Zellen von Ibrutinib-resistenten Mantelzelllymphom-Patienten eine deutliche Aktivierung von AKT trotz suffizienter BTK-Inhibition [132]. Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg könnte somit, wie von Zhao et al. postuliert, einen Bypass um den BCR-Signalweg über die BTK darstellen und den Einfluss des Microenvironments vermitteln [124].

Ob es für die Resistenz von Zelllinien oder Lymphomen in Patienten gegen den Inhibitor einen Schlüsselmechanismus gibt oder es sich um mehrere Prozesse handelt, die zusammenspielen müssen, ist noch nicht geklärt. Ein Mechanismus, der dabei eine Rolle spielt, ist der alternative NF κ B₂ p52 Signalweg [132, 133]. Die Zellen der Z-138 zeigten eine eher schwache Expression des Vorläuferproteins p100, die sich unter Ibrutinibtherapie nicht veränderte. Die aktive Form p52-NF κ B₂ wurde in allen Fraktionen der Z-138 stark exprimiert, in den beiden Fraktionen der Ko-Kultur noch etwas stärker als in der Reinkultur. Durch Ibrutinib wurde die Expression von p52 in der Reinkultur stark vermindert, auch die eingenisteten Zellen zeigten eine deutliche Verminderung während im Überstand eine gesteigerte Expression auftrat. Dies könnte die Bedeutung von NF κ B₂ p52 für die Resistenzentstehung bekräftigen, da insbesondere die Z-138 in der Ko-Kultur nur ein sehr schwaches Ansprechen auf Ibrutinib in der Proliferationsuntersuchung zeigten (vgl. Abb. 23). Rahal et al. konnten für die Z-138 ebenfalls eine deutlich gesteigerte p52-Expression zeigen [133]. Die Zelllinie JeKo-1, die in den Proliferationsuntersuchungen ein besseres Ansprechen auf Ibrutinib gezeigt hatte, wies eine starke Expression von p100 und nur eine sehr schwache Expression von p52-NF κ B₂ auf. Auch dieses Expressionsmuster wurde so von Rahal et al. beobachtet

und die JeKo-1 als sensitive Zelllinie klassifiziert [133]. Chiron et al. konnten im Gegensatz zu den Ergebnissen von Rahal und dieser Arbeit eine deutliche Expression von p52- NF κ B₂ in der JeKo-1 zeigen und beobachteten die Zelllinie außerdem als Ibrutinib-resistent [132].

Dies könnte zu dem Schluss führen, dass, trotz der großen Erfolge in den klinischen Studien und der Zulassung von Ibrutinib zur Therapie des rezidivierten Mantelzelllymphoms [9, 16, 79], die in-vitro Charakterisierung des Inhibitors noch einige Unregelmäßigkeiten aufweist und weiter untersucht werden muss. Neben der Expression des alternativen NF κ B₂-Signalweges und der Beeinflussung durch das Microenvironment über den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg wurden noch weitere Resistenzmechanismen in resistenten Zelllinien oder Zellen resistenter Patienten beschrieben. Dazu gehört zum einen die C481S-Mutation von BTK, die die Bindung von Ibrutinib an die Kinase behindert [132, 134], eine funktionssteigernde Mutation der PLC γ 2 [134], eine Mutation in RELA, einem weiteren Protein der NF κ B-Gruppe [135], aber auch eine Mutation im CCND1-Gen, die zu einem erhöhten CyclinD1-Proteingehalt und zur Resistenz gegen Ibrutinib führt [136]. Auch diese und weitere Mechanismen der Ibrutinibresistenz bedürfen weiterer in-vitro sowie klinischer Untersuchungen. Dennoch zeigen sowohl die Daten der Literatur als auch die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Ibrutinib suffizient den B-Zell-Rezeptor-Signalweg sowie die Interaktion mit dem Feederlayer und damit auch den protektiven Effekt des Microenvironments stören kann und somit ein vielversprechendes Therapeutikum für eine Kombinationstherapie darstellt.

5.2.4. Idelalisib

Ein weiteres Therapeutikum für die Kombinationstherapie ist der PI3K δ -Inhibitor Idelalisib, für den ebenfalls eine Beeinflussung des BCR- beziehungsweise PI3K-Signalfades und damit des protektiven Einflusses des Microenvironment bereits mehrfach beschrieben wurde [81-83]. In der Analyse der Proliferation mittels des One-Glo Luciferase Assay zeigte sich in den untersuchten Zelllinien allgemein nur ein geringes Ansprechen der Zellzahl auf die Idelalisib-Therapie (vgl. Abb. 28). Auch Chiron et al. konnten nur ein geringes Ansprechen durch die Monotherapie beobachten [137]. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Idelalisib, im Gegensatz zu primären CLL-Zellen, in MCL-Zelllinien weder eine Apoptoseinduktion noch einen Zellzyklusarrest verursachte [81, 137]. Auch scheint die PI3K α -Unterform zumindest in rezidivierten Mantelzelllymphomen eine größere Rolle zu spielen als bisher angenommen wurde und

diese Isoform wird vom selektiven PI3K δ -Inhibitor Idelalisib nicht inhibiert [30, 138]. In den Ergebnissen zeigte sich die Tendenz, dass die Wirkung in der Feederlayer-Ko-Kultur teils ausgeprägter war als in den MCL-Zellen alleine. Dies konnte auch von verschiedenen Autoren beobachtet werden, die zum einen eine deutliche Verminderung der Adhäsion von CLL-Zellen an den FL zeigten und zum anderen auch eine Reduktion des protektiven Effektes des FL auf das Überleben der Zellen nachweisen konnten [81-83]. Dabei wird eine Aktivierung von AKT zu ph-AKT durch den Kontakt mit dem Feederlayer mittels Idelalisib-Behandlung deutlich vermindert [81-83]. Dies zeigt, dass Idelalisib einen vielversprechenden Kombinationspartner für zytotoxische Medikamente oder Zellzyklusinhibitoren darstellt [137, 138].

5.2.5. Copanlisib

Der PI3K α/δ -Inhibitor Copanlisib zeigte als Single-Therapeutikum in der Analyse der Proliferation eine deutlich stärkere Wirkung schon bei niedrigeren Konzentrationen als Idelalisib. Diese ausgeprägte Proliferationshemmung konnte auch von verschiedenen Autoren unter anderem in DLBCL-Zellen beobachtet werden [85, 139]. Paul et al. zeigten dabei für die DLBCL-Zellen eine deutliche Apoptoseinduktion durch Copanlisib, was einen Grund für die gute Wirksamkeit darstellte [139]. Auch in Mammakarzinomzellen konnte eine Steigerung der Apoptoserate nachgewiesen werden [85]. Auch für den dualen PI3K-Inhibitor Copanlisib konnte eine Wirkung auf den B-Zell-Rezeptor-Signalpfad sowie die PI3K/AKT/mTOR-Achse gezeigt werden. So wurde in DLBCL-Zellen sowohl die NF κ B-Aktivierung als auch die Phosphorylierung von AKT und p44/42-MAPK durch Copanlisib deutlich herabgesetzt [139]. In einer Phase II Studie an Patienten mit indolenten Lymphomen konnte eine bessere Wirksamkeit von Copanlisib in den Patienten beobachtet werden, deren PI3K- und BCR-Signalpfad mehr Aktivität gezeigt hatten [86]. Dies zeigt, dass Copanlisib durch seine duale PI3K-Inhibition nicht nur ein potentes Therapeutikum darstellt, sondern auch ein interessanter Kombinationspartner für andere Medikamente zur Überwindung des Einflusses des Microenvironments über den BCR- und PI3K-Signalpfad ist.

5.2.6. Plerixafor

Für den CXCR4-Inhibitor Plerixafor wurde von mehreren Autoren gezeigt, dass er die CXCL12-CXCR4-vermittelte Interaktion zwischen einem Stromalen Feederlayer und hämatologischen Zellen stören kann [45, 46, 90, 91]. Diese Inhibition der Zell-Zell-Interaktion bewirkt auch die Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen aus dem

Knochenmark [92]. In der Analyse des One-Glo Luciferase Assay zeigte sich in allen Zelllinien nur eine sehr geringe Wirkung in den Zellen der Reinkultur, also ohne Stimulation des BCR oder des CXCR4. In den Zellen der Ko-Kultur hingegen trat insgesamt eine etwas stärkere Proliferationshemmung auf, da diese Zellen durch den Inhibitor in ihrer Interaktion mit dem Feederlayer gestört werden. Dies zeigten auch Stamatopoulos et al. für CLL- sowie Kim et al. und Kurtova et al. in MCL-Zellen, die eine deutlich verminderte Migration und Einnistung in den Feederlayer unter der Behandlung mit Plerixafor bzw. einem CXCR4-Antikörper beobachteten. Sie konnten darüberhinaus auch eine Feederlayer-induzierte Resistenz gegen verschiedene Medikamente durch die Behandlung mit Plerixafor reduzieren [45, 46, 90]. Dabei zeigten sie auch, dass die CAM-DR durch den Feederlayer vor allem in den eingesteten Zellen zu Stande kam und weniger in den Zellen im Überstand. Plerixafor inhibierte dabei die vermittelte Resistenz genau in den eingesteten Zellen [45, 46]. Die Stimulation der Lymphomzellen durch die Ko-Kultur, die sich über eine Phosphorylierung der p44/42-MAPK oder von AKT zeigt, wurde durch Plerixafor ebenfalls inhibiert [45, 46]. Dies zeigt, dass der Inhibitor Plerixafor, obwohl er als single-drug nur sehr geringe Effekte in MCL-Zellen aufwies, ein vielversprechendes Kombinationstherapeutikum zur Überwindung des protektiven Effektes des stromalen Microenvironments darstellt.

5.3. Kombinationstherapie

Nach der Analyse der verschiedenen Therapeutika in der Monotherapie wird deutlich, dass der Einfluss des Microenvironments, im Rahmen dieser Arbeit durch die Feederlayer-Ko-Kultur realisiert, eine sehr große Rolle für die Wirkung eines Medikaments beziehungsweise für die Resistenz der Tumorzellen gegen diese Therapie spielt. Um diesen Einfluss zu reduzieren wurden verschieden Therapeutika untersucht, die einen Einfluss auf die Einnistung beziehungsweise die CAM-DR gezeigt hatten. Diese wurden im weiteren Verlauf auf synergistische, additive oder antagonistische Wirkung in den unterschiedlichen Kombinationstherapien untersucht.

5.3.1. Cytarabin und Ibrutinib

Zunächst wurde das in der MCL-Therapie etablierte Zytostatikum Cytarabin mit verschiedenen Inhibitoren des BCR- beziehungsweise PI3K-Signalweges und des CXCR4-Rezeptors kombiniert. Damit wurde zum einen die Verlässlichkeit der

Methoden, eine Kombinationstherapie zu untersuchen und auszuwerten, nachgewiesen und zum anderen gezeigt, ob die verwendeten Inhibitoren den protektiven Effekt des Feederlayers in der Kombinationstherapie abschwächen konnten.

Für die Kombination von Ibrutinib und Cytarabin konnte in den Proliferationsversuchen mittels Vi-Cell-Zellzahlbestimmung in zwei Zelllinien eine deutlich stärker ausgeprägte Reduktion der Zellzahl durch die Kombination als durch die Monotherapie erzielt werden. Dabei zeigte sich der stärkste Effekt in der Fraktion der eingenisteten Zellen, welche in der Cytarabin-Single-Therapie eine ausgeprägte CAM-DR zeigten, die jedoch auf die Ibrutinib-Therapie das größte Ansprechen aller Fraktionen zeigten (vgl. Abb. 35). Der durch die CAM-DR in der Cytarabin-Therapie verursachte signifikante Unterschied zwischen den eingenisteten Zellen und der Reinkultur sowie des Überstandes wurde durch die Kombinationstherapie aufgehoben bzw. zumindest deutlich vermindert. Die Zelllinie Mino zeigte keine verbesserte Wirksamkeit durch die Kombinationstherapie. In der zugehörigen Analyse der Apoptoserate konnte ein analoges Muster beobachtet werden. In den beiden auf die Kombinationstherapie sensiblen Zelllinien wurde in den eingenisteten Zellen eine signifikante Zunahme der Apoptoserate durch die Kombination im Vergleich zur Monotherapie erzielt (vgl. Abb. 36). Der Unterschied zu den Zellen der Reinkultur und im Überstand durch den protektiven Effekt des Feederlayers konnte auch in der Apoptoseinduktion durch die Kombination von Cytarabin mit Ibrutinib im Vergleich zur Cytarabin-Monotherapie deutlich vermindert werden. Zhao et al. sowie Simon-Gabriel et al. konnten in MCL-Zellen in der FL-Ko-Kultur ebenfalls eine Verminderung der CAM-DR und des protektiven Effektes des FL auf die Lymphomzellen durch Ibrutinib beobachten. Auch deren Daten wiesen eine Sensitivierung auf zytotoxische Medikamente nach, die sich in einer erhöhten Apoptoseinduktion und verminderten Proliferation im Vergleich zur Monotherapie zeigte [123, 124]. Die Verminderung des protektiven Effektes der FL-Ko-Kultur durch die Ibrutinib-Therapie wurde, wie bereits dargelegt, sowohl für MCL- als auch für CLL-Zellen von weiteren Autoren beobachtet [30, 34, 37].

In der Analyse der Proliferation über die Aktivität der One-Glo Luciferase konnte ein ähnliches Bild beobachtet werden. Hierbei zeigte sich bereits in der Reinkultur ohne den Einfluss des Feederlayers eine durchweg additive Wirkungsverstärkung durch die Kombinationstherapie von Cytarabin mit Ibrutinib. Pighi et al. und Cinar et al. fanden sowohl in primären MCL-Zellen als auch in Zelllinien einen konstitutiv aktivierten BCR-Signalweg, in dem unter anderem BTK auch ohne externe Stimulation aktiviert

war [42, 131], was den Grund für die additive Kombinationswirkung von Ibrutinib darstellen könnte. In der Ko-Kultur mit dem FL konnte in den meisten Zelllinien eine überwiegend synergistische Wirkungsverstärkung durch die Kombinationstherapie nachgewiesen werden (vgl. Tab. 3), die Therapeutika wirkten also zusammen stärker als aus ihrer jeweiligen Einzelwirkung zu erwarten gewesen wäre [117]. Auch die Zelllinie Z-138, für die die verwendete Cytarabinkonzentration etwas zu hoch war, zeigte in der Ko-Kultur eine deutliche Tendenz zum Synergismus der Kombinationstherapie. Die deutliche Reduktion des Unterschiedes zwischen den Zellen mit und ohne FL-Ko-Kultur durch die Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie mit Cytarabin wies ebenso auf die Verminderung der CAM-DR hin. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Kombination von Cytarabin und Ibrutinib somit, dass der protektive Effekt des Feederlayers auf die Lymphomzellen, der diese vor der Wirkung des Zytostatikums Cytarabin schützt (CAM-DR), erfolgreich durch die gleichzeitige Therapie mit Ibrutinib und damit durch die Beeinflussung des BCR-Signalpfades vermindert werden konnte. Dies wurde von verschiedenen Autoren wie oben angeführt ebenfalls beobachtet. Diese Ergebnisse suggerieren, dass Ibrutinib als Kombinationspartner auch für anderen Medikamente geeignet sein könnte.

5.3.2. Cytarabin und Idelalisib

Für die Kombination von Cytarabin mit dem PI3K δ -Inhibitor Idelalisib konnte ebenfalls eine stärkere Wirkung in der gemeinsamen Gabe der Therapeutika im Vergleich zur Monotherapie festgestellt werden. Die Analyse der Fractional Products zeigte dabei, dass eine verstärkte Wirkung vor allem in der Ko-Kultur mit dem FL auftrat. Für die Zelllinie JeKo-1 und auch für die Maver-1 in der niedrigen Konzentration zeigte sich sogar ein Synergismus für die Kombination der beiden Therapeutika in der Ko-Kultur (vgl. Tab. 4). Dass Idelalisib den protektiven Effekt durch die FL-Ko-Kultur vermindert, zeigt sich auch in der deutlichen Reduktion der CAM-DR unter der Kombinationstherapie im Vergleich zur Cytarabin-Monotherapie. Dies lies sich aus dem verringerten Unterschied zwischen der Rein- und der Ko-Kultur schließen, der in allen Zelllinien beobachtet werden konnte. Mehrere Autoren zeigten, dass die Therapie mit Idelalisib die Einnistung und Adhäsion an den Feederlayer von MCL- und CLL-Zellen stören kann [83, 124]. Die verminderte Einnistung sowie die PI3K-Inhibition in den verbliebenen Zellen bewirkte eine Hemmung des weiteren BCR- sowie PI3K-Signalpfades und dadurch eine Verminderung des protektiven Effektes durch das Microenvironment. Dies zeigte sich in einer verminderten Expression von ph-AKT,

einer Proliferationshemmung sowie einer erhöhten Apoptose [81-83, 136, 137]. Zusammengefasst lassen die Ergebnisse dieser Arbeit in der Zusammenschau mit der Literatur schließen, dass Idelalisib einen deutlichen Einfluss auf den Effekt der FL-Ko-Kultur nahm, dabei den BCR- und PI3K-Signalpfad hemmte und die CAM-DR vermindern konnte, was zu einer Wirkungsverstärkung in der Kombinationstherapie mit dem Zytostatikum Cytarabin führte. Dies zeigt, dass auch Idelalisib ein vielversprechender Kombinationspartner für weitere Therapeutika ist.

5.3.3. Cytarabin und Plerixafor

Neben der Hemmung in den Signalwegen des BCR oder der PI3K kann die Interaktion von Lymphomzellen mit dem Microenvironment auch über die Hemmung des CXCR4-Rezeptors gestört werden [46]. Für die Kombination des CXCR4-Inhibitors Plerixafor mit Cytarabin konnte in der Reinkultur erwartungsgemäß kein zusätzlicher Effekt beobachtet werden, da keine Interaktion über den gehemmten Rezeptor stattfindet. In der Ko-Kultur mit dem FL hingegen wurde eine Wirkungssteigerung beobachtet, das Fractional Product zeigte überwiegend eine additive Wirkung der gemeinsamen Gabe von Cytarabin und Plerixafor. Wie bereits dargestellt ist Plerixafor in der Lage den protektiven Einfluss des Microenvironments zu vermindern und die Einnistung in den Feederlayer zu stören. Dadurch wird die FL-vermittelte CAM-DR herabgesetzt und die Wirkung des Zytostatikums in den Lymphomzellen der Ko-Kultur verstärkt. Dies zeigten sowohl die Ergebnisse dieser Arbeit als auch Kim et al., Kurtova et al. sowie Stamatopoulos et al. für MCL- und CLL-Zellen [45, 46, 90]. Plerixafor zeigte somit zwar eine geringer ausgeprägte Wirkungssteigerung in der Kombinationstherapie, konnte aber dennoch den protektiven Effekt der Ko-Kultur unabhängig vom eigentlichen B-Zell-Rezeptor- und PI3K-Signalweg vermindern. Dies suggeriert nicht nur eine Kombinationsmöglichkeit mit herkömmlichen zytotoxischen Medikamenten oder mit Zellzyklusinhibitoren, sondern auch mit Inhibitoren des BCR, was eine stärkere Hemmung der Interaktion mit dem Feederlayer ermöglichen könnte.

5.3.4. Ibrutinib und Plerixafor

Für die Therapie von MCL-Zellen in der FL-Ko-Kultur mit Ibrutinib wurde gezeigt, dass, trotz der suffizienten BTK-Inhibition und der daraus resultierenden Hemmung des BCR-Signalpfades, das Microenvironment weiter einen deutlichen Einfluss auf die Lymphomzellen hatte. Dies zeigte sich wie bereits dargelegt an der Aktivierung von MEK1/2 oder AKT in verschiedenen Fraktionen der Ko-Kultur (vgl. Abb. 20 und 22).

Auch Zhao et al. konnte zeigen, dass die Aktivierung über den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg eine wichtige Rolle in Ibrutinib-resistenten Zellen spielt [124]. Diese Beobachtungen suggerieren, dass das Microenvironment trotz Ibrutinib-Therapie einen verbleibenden protektiven Einfluss auf die Lymphomzellen ausüben könnte. Eine zusätzliche vom BCR- und PI3K-Signalweg unabhängige Hemmung dieser Interaktion mit dem CXCR4-Inhibitor Plerixafor zeigte in der Reinkultur nur einen geringen Effekt gegenüber der Ibrutinib-Monotherapie. In der FL-Ko-Kultur ließ sich unter der Kombination eine etwas stärkere Wirkung beobachten, die Verstärkung erwies sich als überwiegend additiv. Lediglich in der Zelllinie JeKo-1 zeigte sich in der Ko-Kultur eine deutlich synergistische Wirkung der Kombination gegenüber der Ibrutinib-Monotherapie. Diese Zelllinie hatte in den Western Blot Analysen eine ausgeprägte Aktivierung von AKT in den eingenisteten Zellen der Ko-Kultur unter Ibrutinib-Therapie gezeigt (vgl. Abb. 22), was die deutlichere Wirkungssteigerung in der Kombinationstherapie gegenüber Ibrutinib im Vergleich zu den anderen Zelllinien erklären könnte. Eine vom Microenvironment verursachte Aktivierung von AKT sowie p44/42-MAPK wurde durch eine Plerixafor-Therapie deutlich vermindert, wie unter anderem von Kim et al. in MCL-Zellen nachgewiesen worden war [45, 46]. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine Kombinationstherapie von Ibrutinib mit einem weiteren Therapeutikum, das den protektiven Effekt des Microenvironments inhibiert, die Wirkung verstärken oder sogar gegen Ibrutinib-resistente Zellen wirken kann [124].

5.3.5. Idelalisib und Plerixafor

Für die Therapie mit Idelalisib wurden zum einen klinisch vermehrt Resistenzen beobachtet und zum anderen gezeigt, dass nicht nur die PI3K δ -Isoform, sondern auch die von Idelalisib nicht inhibierte PI3K α -Isoform eine wichtige Rolle für das Überleben der Lymphomzellen spielt [30, 138]. Aus diesem Grund sprechen die MCL-Zellen besser auf eine Therapie mit einem dualen PI3K-Inhibitor an, wie der Vergleich der Monotherapie von Idelalisib (PI3K δ -Inhibitor) mit Copanlisib (PI3K α/δ -Inhibitor) zeigte (vgl. Abb. 28 und 29). Diese verbesserte Wirksamkeit der dualen PI3K-Inhibition wurde auch von Jerkeman et al. sowie Seiler et al. beobachtet [30, 138]. Somit scheint der Einfluss des Microenvironments trotz der PI3K δ -Inhibition weiter eine Rolle zu spielen. Folgerichtig konnte durch die Kombination mit Plerixafor in der Reinkultur keine Wirkungssteigerung beobachtet werden, da keine Stimulation durch den Feederlayer über den CXCR4-Rezeptor erfolgte. In der Ko-Kultur hingegen zeigte sich in drei von vier Zelllinien eine teils additive, teils synergistische Wirkungssteigerung

durch die gemeinsame Gabe von Idelalisib und Plerixafor im Vergleich zur Monotherapie. Diese Wirkungssteigerung zeigte, dass die alleinige Therapie mit Idelalisib wahrscheinlich nicht ausreicht, um die Stimulation durch das Microenvironment zu inhibieren, was auch Chiron et al. beobachteten, die keine dauerhafte ph-AKT-Inhibition durch Idelalisib-Monotherapie erreicht hatten [137]. Durch die Kombination von Idelalisib mit Plerixafor konnte der protektive Effekt des FL in zwei verschiedenen Signalwegen inhibiert und dadurch eine häufig synergistische gemeinsame Wirkung erzielt werden.

5.3.6. Copanlisib und Plerixafor

Copanlisib als PI3K α/δ -Inhibitor zeigte bereits in der Monotherapie ein deutlich stärkeres Ansprechen als Idelalisib. In der Kombination mit Plerixafor konnte in der Reinkultur keine zusätzliche Wirkung durch die gemeinsame Gabe der Inhibitoren erzielt werden. In den Lymphomzellen der FL-Ko-Kultur ergab sich für diese Kombination ebenso keine deutliche Wirkungsverstärkung, der Effekt erwies sich bei geringer Eigenwirkung von Plerixafor als additiv. Dies zeigt, dass Copanlisib bereits in der Monotherapie sehr wirksam ist und den Einfluss des Microenvironments soweit inhibiert, dass eine Kombination mit dem CXCR4-Inhibitor keinen großen zusätzlichen Nutzen bringt. Paul et al. hatten ebenfalls gezeigt, dass bereits eine Monotherapie mit Copanlisib zu einer deutlichen Inhibition von ph-AKT und ph-p44/42-MAPK als Teil des BCR- und PI3K-Signalpfades führte [139]. Die duale Hemmung von PI3K α und δ scheint also, neben der suffizienten Proliferationsinhibition (vgl. Abb. 40) und Apoptoseinduktion [85, 139] auch den protektiven Einfluss des Feederlayers stark zu vermindern.

5.3.7. Abemaciclib und Ibrutinib

Für die Mono-Therapie von MCL-Zelllinien mit Abemaciclib hat sich sowohl in den Proliferationsversuchen mittels Vi-Cell Zellzahlbestimmung als auch in der Analyse mittels One-Glo Luciferase Assay ein protektiver Effekt des Feederlayers auf die Lymphomzellen der Ko-Kultur gezeigt. Im Vi-Cell Zählversuch konnte hierbei noch weiter aufgeschlüsselt werden, dass die Fraktion der eingesteten Zellen eine starke CAM-DR zeigt, wohingegen die Zellen im Überstand der Ko-Kultur teils sogar stärker als die der Reinkultur durch Abemaciclib inhibiert werden (vgl. Abb. 6 und 7). Für Ibrutinib hat sich in den Vi-Cell Proliferationsversuchen gezeigt, dass die Wirkung gerade in der Fraktion der eingesteten Zellen am stärksten ausgeprägt war (vgl. Abb.

15). Des Weiteren konnte durch Ibrutinib in der Kombinationstherapie mit Cytarabin, wie bereits dargelegt, der protektive Effekt des Feederlayers, der die Lymphomzellen vor der zytostatischen Wirkung einer Cytarabin-Monotherapie schützt, deutlich vermindert werden (vgl. Abb. 33-35). Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch die CAM-DR in der Abemaciclib-Monotherapie durch eine Kombination mit Ibrutinib vermindert werden könnte.

Bereits in der Reinkultur konnte in allen Zelllinien eine sehr deutliche Wirkungssteigerung durch die gleichzeitige Gabe von Abemaciclib und Ibrutinib erreicht werden, die sich in der Analyse des Fractional Products als mindestens additiv und in vielen Konzentrationen sogar als synergistisch erwies (vgl. Tab. 1). Obwohl also in der Reinkultur keine Stimulation des B-Zell-Rezeptors durch den Feederlayer erfolgte, erzielte die zusätzliche Gabe von Ibrutinib einen deutlichen zusätzlichen Effekt. Der Grund hierfür könnte die bereits spontan relativ stark ausgeprägte Expression von pBTK sein, die sich in unbehandelten MCL-Zellen zeigte (vgl. Abb 19). Diese spontane Aktivierung des BCR-Signalweges einschließlich der BTK ohne Stimulation durch einen FL wurde auch von Pighi et al. sowie Cinar et al. beschrieben [42, 131]. Es könnte nun sein, dass die Lymphomzellen durch die CDK4/6-Inhibition unter eine stärkere Abhängigkeit von der spontanen BCR-Aktivität gerieten und deshalb die Kombination von Abemaciclib und Ibrutinib in der Reinkultur eine deutliche Wirkungssteigerung gegenüber der Monotherapie zeigte. Diese Hypothese müsste durch weitere Untersuchungen der Proteinexpression des BCR-Signalweges unter Abemaciclib und Ibrutinib Kombinationstherapie überprüft werden. In den MCL-Zellen in der Ko-Kultur mit dem murinen oder der humanen Feederlayer zeigte sich mit einer Ausnahme ebenfalls eine deutliche Wirkungssteigerung der Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie. Die Analyse des Fractional Product zeigte in allen Zelllinien deutlich additive bis synergistische Wirkungssteigerungen. Auch unter dem Einfluss des Microenvironments zeigte die Kombination mit Ibrutinib einen Nutzen und sie konnte die CAM-DR, welche in der Abemaciclib-Monotherapie meist deutlich ausgeprägt war, vermindern. Die Inhibition des protektiven Effektes funktionierte also analog zur Kombination von Cytarabin und Ibrutinib, welche bereits dargelegt wurde (vgl. Abb. 31 und 32 sowie Tab. 1) und der Beobachtung verschiedener Autoren, dass der protektive Effekt des Microenvironments durch Ibrutinib vermindert werden kann [30, 34, 123, 124, 130]. Dies scheint somit nicht nur für die meistens beobachtete Protektion vor einer Apoptoseinduktion sondern auch für die hier analysierte Proliferationshemmung durch die CDK4/6-Inhibition zu gelten. Um die Auswirkungen

auf den Zellzyklusarrest und die resultierende Hemmung der Proliferation genauer zu charakterisieren, sind in Zukunft weitere Untersuchungen unter anderem mittels durchflusszytometrischer Zellzyklusanalyse notwendig. Auch mögliche Effekte auf das Zellüberleben und die Apoptose, wie sie von Chiron et al. für die Kombination von PI3K- und CDK4/6-Inhibitoren beschrieben wurden, müssten weiter evaluiert werden [137]. Der Unterschied zwischen den behandelten Zellen der Reinkultur und der Ko-Kultur, der durch den protektiven Effekt verursacht wird, konnte auch von der Kombinationstherapie nur teilweise vermindert werden. Der Einfluss des Feederlayers wurde somit auch hier, wie schon bei den vorhergehenden Versuchen dargelegt, nicht nur über den BCR-Signalweg und die BTK vermittelt. Trotz der Inhibition von BTK durch Ibrutinib kann das Microenvironment seinen Einfluss weiterhin unter anderem über den PI3K-Signalweg oder der CXCR4-Rezeptor vermitteln [45, 77, 124]. Ob die Mehrfach-Kombination mit Inhibitoren weiterer Interaktionswege des Microenvironment den protektiven Effekt stärker vermindern oder gar aufheben kann müssen weitere Untersuchungen zeigen. Ebenfalls sollte die Auswirkung dieser Kombinationstherapie auf die Fraktionen ÜS und EZ einzeln untersucht werden.

5.3.8. Abemaciclib und Plerixafor

Die Kombination von Abemaciclib mit dem CXCR4-Inhibitor Plerixafor in der Linie JeKo-1 zeigte keine nennenswerte Wirkungsverstärkung im Vergleich zur Monotherapie. Da Plerixafor selbst nur eine sehr geringe Wirkung zeigte, errechnet sich dennoch ein additives Fractional Product. Dieses wies dabei in den Zellen der Ko-Kultur deutlich mehr in Richtung Synergismus als in den Zellen der Reinkultur, da Plerixafor dort den Stimulus durch und die Einnistung in den Feederlayer hemmte [45]. Die Stimulation des Microenvironments über den CXCR4-Rezeptor spielt für die CAM-DR gegen zytotoxische Medikamente eine wichtige Rolle, wie die Versuche mit Plerixafor und Cytarabin (vgl. Abb. 41) und verschiedene Autoren für weitere Substanzen gezeigt hatten [45, 46, 90]. Im Gegensatz zur Kombination von Abemaciclib mit Ibrutinib brachte die Kombination von Abemaciclib und Plerixafor kaum einen Vorteil. Dies deutet darauf hin, dass die Stimulation über den CXCR4-Rezeptor im Gegensatz zur Behandlung mit zytotoxischen Medikamenten in der CAM-DR gegen den Zellzyklusinhibitor Abemaciclib nur eine untergeordnete Rolle spielt. Gleichwohl bedarf es weiterer Untersuchungen unter anderem zum Verhalten des Zellzyklus unter dieser Kombinationstherapie und in der FL-Ko-Kultur um diese Hypothese zu prüfen.

5.4. Übersicht und Ausblick

Abemaciclib zeigte als Zellzyklusinhibitor eine deutliche Hemmung der Proliferation von MCL-Zellen sowohl mit als auch ohne Kontakt zu einem Stromalen Feederlayer. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass das Microenvironment substanziellen Einfluss auf die Wirkung des Inhibitors nahm und vor allem in den eingestrieten Zellen eine starke CAM-DR vermittelte. Dieser protektive Effekt konnte auch bei dem Zytostatikum Cytarabin beobachtet werden. Die Inhibitoren Ibrutinib, Idelalisib und Plerixafor waren in unterschiedlicher Ausprägung in der Lage, sowohl die zellvermittelte Resistenz unter der Cytarabin-Therapie als auch unter der Abemaciclib-Therapie zu vermindern. Eine Kombination von zytotoxischen Medikamenten oder Zellzyklusinhibitoren mit einem Inhibitor der Zell-Zell-Interaktion zwischen Lymphomzellen und Feederlayer stellt somit einen wirkungsvollen und vielversprechenden Therapieansatz dar und unterstreicht die Bedeutung des Microenvironments für die Pathogenese und Therapie des Mantelzelllymphoms.

Bei der in-vitro Charakterisierung von Ibrutinib zeigten sich sowohl im Rahmen dieser Arbeit als auch in der Literatur einige Unregelmäßigkeiten hinsichtlich der Resistenz von verschiedenen Zellen gegen Proliferationshemmung, Apoptoseinduktion und Proteinexpressionshemmung. Diesbezüglich sowie zur weiteren Einschätzung der beschriebenen Ibrutinib-Resistenzmechanismen werden weitere Untersuchungen auch unter Berücksichtigung des Microenvironments nötig sein. Plerixafor verstärkte die Wirkung von BTK- und PI3K-Inhibitoren in der Ko-Kultur. Welche Auswirkungen diese Kombination beispielsweise auf die Proteinexpression hat, bedarf weiteren Untersuchungen. Auch eine Mehrfach-Kombination von BCR-/PI3K-/CXCR4-Inhibitoren mit Zellzyklusinhibitoren oder Zytostatika erscheint denkbar und sollte evaluiert werden. Um den Mechanismus und die Auswirkungen der CAM-DR gegen Abemaciclib exakter beschreiben zu können, sollten durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen unter Trennung der einzelnen Fraktionen der FL-Ko-Kultur durchgeführt werden. Auch für die additive bis synergistische Kombinationswirkung von Abemaciclib und Ibrutinib sind, zum genaueren Verständnis der Auswirkungen auf die Zellen, Analysen von Zellzyklus und Apoptose unter Trennung der Fraktionen nötig.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der CDK4/6-Inhibitor Abemaciclib eine zeitlich und konzentrationsabhängig ansteigende Wirkung auf die Proliferation von MCL-Zelllinien sowohl mit als auch ohne Feederlayer-Ko-Kultur hat. Der protektive Effekt der FL-Ko-Kultur, der sich unter zytotoxischen Medikamenten wie dem Zytostatikum Cytarabin sowohl auf die Zellzahl als auch die Apoptoserate auswirkt, bewirkte auch unter Abemaciclib eine deutliche CAM-DR. Die Ko-Kultur mit Feederlayerzellen humanen oder murinen Ursprungs erwies sich hierbei als zumindest überwiegend gleichwertig. Dabei war der protektive Effekt in der Fraktion der eingesteten Zellen am stärksten ausgeprägt. Die CAM-DR kam nicht durch eine geringere molekulare Wirkung von Abemaciclib in dieser Fraktion, sondern durch die Stimulation der Lymphomzellen durch den FL unter anderem über den BCR-, den PI3K- und den CXCR4-Signalweg zustande. Die Ko-Kultur vermittelte Resistenz zeigte unter Behandlung mit dem Zytostatikum Cytarabin das gleiche Muster in den verschiedenen Fraktionen. Ibrutinib zeigte im Gegensatz dazu die stärkste Wirkung in den eingesteten Zellen durch eine Inhibition der BTK und damit des BCR-Signalpfades, wenngleich nicht der komplette Einfluss des FL aufgehoben wurde. Über Signalwege wie dem PI3K/AKT/mTOR-Pfad konnte die Ko-Kultur weiterhin einen protektiven Einfluss ausüben.

Die Kombination des Zytostatikums Cytarabin mit Ibrutinib, Idelalisib oder Plerixafor verminderte in unterschiedlichem Umfang den protektiven Effekt der FL-Ko-Kultur in der Analyse der Proliferation und der Apoptoserate. Die beiden Inhibitoren des BCR- bzw. PI3K-Signalpfades zeigten dabei teilweise eine synergistische Wirkungssteigerung mit Cytarabin. Dennoch konnte die CAM-DR durch die Kombination des Zytostatikums mit einem Inhibitor nicht gänzlich aufgehoben werden. Auch die Kombination von Abemaciclib mit Ibrutinib zeigte eine additive bis synergistische Wirkungssteigerung im Vergleich zur Monotherapie in An- und Abwesenheit des FL. Doch auch hier blieb der protektive Effekt des FL zumindest teilweise bestehen. Der CXCR4-Signalweg schien für die CAM-DR gegen Abemaciclib nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da eine Kombination von Abemaciclib mit Plerixafor nur einen sehr geringen zusätzlichen Effekt zeigte. Der protektive Effekt, der die Zellen vor der Wirkung von Abemaciclib oder Cytarabin schützt, konnte durch die Kombination mit nur einem Inhibitor der Interaktion von MCL- und FL-Zellen nicht gänzlich aufgehoben werden.

Die gemeinsame Gabe von zwei Inhibitoren des BCR-/PI3K-/CXCR4-Signalweges zeigte in der Ko-Kultur eine Wirkungssteigerung. Damit liegt die Vermutung nahe, dass durch eine Mehrfach-Kombination dieser Inhibitoren die CAM-DR gegen Zytostatika oder Zellzyklusinhibitoren weiter vermindert werden könnte.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit zeigten zum einen die Wirksamkeit des Zellzyklusinhibitors Abemaciclib in MCL-Zelllinien. Zum anderen wurde die große Bedeutung eines protektiven Effektes durch das Microenvironment auf die Lymphomzellen sowohl für die Therapie mit Zellzyklusinhibitoren als auch mit Zytostatika nachgewiesen. Die Kombination mit Inhibitoren der für die Interaktion von Lymphom- und FL-Zellen wichtigen Signalwege, wie des BCR-, PI3K-, und CXCR4-Signalfades, zeigte erfolgsversprechende Ergebnisse zur Überwindung der CAM-DR und stellt eine vielversprechende zukünftige Therapiemöglichkeit dar.

7. Literaturverzeichnis

1. Perez-Galan, P., M. Dreyling, and A. Wiestner, *Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era*. *Blood*, 2011. **117**(1): p. 26-38.
2. Banks, P.M., et al., *Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data*. *Am J Surg Pathol*, 1992. **16**(7): p. 637-40.
3. Zhou, Y., et al., *Incidence trends of mantle cell lymphoma in the United States between 1992 and 2004*. *Cancer*, 2008. **113**(4): p. 791-8.
4. Sant, M., et al., *Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project*. *Blood*, 2010. **116**(19): p. 3724-34.
5. Epperla, N., et al., *Incidence and survival trends in mantle cell lymphoma*. *Br J Haematol*, 2017.
6. Herrmann, A., et al., *Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(4): p. 511-8.
7. Hoster, E., et al., *A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma*. *Blood*, 2008. **111**(2): p. 558-65.
8. Martin, P., et al., *Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(8): p. 1209-13.
9. Martin, P., P. Ghione, and M. Dreyling, *Mantle cell lymphoma - Current standards of care and future directions*. *Cancer Treat Rev*, 2017. **58**: p. 51-60.
10. Abrisqueta, P., et al., *Observation as the initial management strategy in patients with mantle cell lymphoma*. *Ann Oncol*, 2017. **28**(10): p. 2489-2495.
11. Abrahamsson, A., et al., *Real world data on primary treatment for mantle cell lymphoma: a Nordic Lymphoma Group observational study*. *Blood*, 2014. **124**(8): p. 1288-95.
12. Cohen, J.B., et al., *Deferred therapy is associated with improved overall survival in patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma*. *Cancer*, 2016. **122**(15): p. 2356-63.
13. Tiemann, M., et al., *Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network*. *Br J Haematol*, 2005. **131**(1): p. 29-38.
14. Campo, E., M. Raffeld, and E.S. Jaffe, *Mantle-cell lymphoma*. *Semin Hematol*, 1999. **36**(2): p. 115-27.
15. Dreyling, M. and W. Hiddemann, *Current treatment standards and emerging strategies in mantle cell lymphoma*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2009: p. 542-51.
16. Dreyling, M., et al., *[Current therapeutic strategies for mantle cell lymphoma]*. *Internist (Berl)*, 2016. **57**(3): p. 230-7.
17. Jares, P., D. Colomer, and E. Campo, *Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(10): p. 750-62.
18. Ewen, M.E., et al., *Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins*. *Cell*, 1993. **73**(3): p. 487-97.
19. Jares, P., D. Colomer, and E. Campo, *Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(10): p. 3416-23.

20. Wiestner, A., et al., *Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival*. *Blood*, 2007. **109**(11): p. 4599-606.
21. Hernandez, L., et al., *p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas*. *Blood*, 1996. **87**(8): p. 3351-9.
22. Pinyol, M., et al., *Inactivation of RB1 in mantle-cell lymphoma detected by nonsense-mediated mRNA decay pathway inhibition and microarray analysis*. *Blood*, 2007. **109**(12): p. 5422-9.
23. Royo, C., et al., *The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma*. *Semin Cancer Biol*, 2011. **21**(5): p. 322-34.
24. Camacho, E., et al., *ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances*. *Blood*, 2002. **99**(1): p. 238-44.
25. Bea, S., et al., *Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling*. *Blood*, 2009. **113**(13): p. 3059-69.
26. Hartmann, E.M., et al., *Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling*. *Blood*, 2010. **116**(6): p. 953-61.
27. Kridel, R., et al., *Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma*. *Blood*, 2012. **119**(9): p. 1963-71.
28. Mozos, A., et al., *SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype*. *Haematologica*, 2009. **94**(11): p. 1555-62.
29. Ek, S., et al., *Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma*. *Blood*, 2008. **111**(2): p. 800-5.
30. Jerkeman, M., et al., *Targeting of B-cell receptor signalling in B-cell malignancies*. *J Intern Med*, 2017. **282**(5): p. 415-428.
31. Zhong, Y., J.C. Byrd, and J.A. Dubovsky, *The B-cell receptor pathway: a critical component of healthy and malignant immune biology*. *Semin Hematol*, 2014. **51**(3): p. 206-18.
32. Hashimoto, S., N. Chiorazzi, and P.K. Gregersen, *The complete sequence of the human CD79b (Ig beta/B29) gene: identification of a conserved exon/intron organization, immunoglobulin-like regulatory regions, and allelic polymorphism*. *Immunogenetics*, 1994. **40**(2): p. 145-9.
33. Gauld, S.B. and J.C. Cambier, *Src-family kinases in B-cell development and signaling*. *Oncogene*, 2004. **23**(48): p. 8001-6.
34. Bernard, S., et al., *Inhibitors of BCR signalling interrupt the survival signal mediated by the micro-environment in mantle cell lymphoma*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(12): p. 2761-2774.
35. Dal Porto, J.M., et al., *B cell antigen receptor signaling 101*. *Mol Immunol*, 2004. **41**(6-7): p. 599-613.
36. Mohamed, A.J., et al., *Signalling of Bruton's tyrosine kinase, Btk*. *Scand J Immunol*, 1999. **49**(2): p. 113-8.
37. Herman, S.E., et al., *Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765*. *Blood*, 2011. **117**(23): p. 6287-96.
38. Okkenhaug, K. and J.A. Burger, *PI3K Signaling in Normal B Cells and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2016. **393**: p. 123-142.

39. Pearce, L.R., D. Komander, and D.R. Alessi, *The nuts and bolts of AGC protein kinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(1): p. 9-22.
40. Okkenhaug, K., *Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 675-704.
41. Matsuda, S., et al., *Critical role of class IA PI3K for c-Rel expression in B lymphocytes*. Blood, 2009. **113**(5): p. 1037-44.
42. Pighi, C., et al., *Phospho-proteomic analysis of mantle cell lymphoma cells suggests a pro-survival role of B-cell receptor signaling*. Cell Oncol (Dordr), 2011. **34**(2): p. 141-53.
43. Young, R.M. and L.M. Staudt, *Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies*. Nat Rev Drug Discov, 2013. **12**(3): p. 229-43.
44. Burger, J.A., et al., *The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies*. Blood, 2009. **114**(16): p. 3367-75.
45. Kurtova, A.V., et al., *Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting*. Blood, 2009. **113**(19): p. 4604-4613.
46. Kim, Y.R. and K.S. Eom, *Simultaneous Inhibition of CXCR4 and VLA-4 Exhibits Combinatorial Effect in Overcoming Stroma-Mediated Chemotherapy Resistance in Mantle Cell Lymphoma Cells*. Immune Netw, 2014. **14**(6): p. 296-306.
47. Shain, K.H., W.S. Dalton, and J. Tao, *The tumor microenvironment shapes hallmarks of mature B-cell malignancies*. Oncogene, 2015.
48. Rosich, L., et al., *Dual PI3K/mTOR inhibition is required to effectively impair microenvironment survival signals in mantle cell lymphoma*. Oncotarget, 2014. **5**(16): p. 6788-6800.
49. Quiroga, M.P., et al., *B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406*. Blood, 2009. **114**(5): p. 1029-37.
50. Medina, D.J., et al., *Mesenchymal stromal cells protect mantle cell lymphoma cells from spontaneous and drug-induced apoptosis through secretion of B-cell activating factor and activation of the canonical and non-canonical nuclear factor kappaB pathways*. Haematologica, 2012. **97**(8): p. 1255-63.
51. Kern, C., et al., *Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway*. Blood, 2004. **103**(2): p. 679-88.
52. Gehrke, I., et al., *Bone marrow stromal cell-derived vascular endothelial growth factor (VEGF) rather than chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell-derived VEGF is essential for the apoptotic resistance of cultured CLL cells*. Mol Med, 2011. **17**(7-8): p. 619-27.
53. Hoster, E., et al., *Prognostic Value of Ki-67 Index, Cytology, and Growth Pattern in Mantle-Cell Lymphoma: Results From Randomized Trials of the European Mantle Cell Lymphoma Network*. J Clin Oncol, 2016. **34**(12): p. 1386-94.
54. Rummel, M.J., et al., *Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial*. Lancet, 2013. **381**(9873): p. 1203-10.
55. Dreyling, M., et al., *Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2017. **28**(suppl_4): p. iv62-iv71.
56. Dreyling, M., et al., *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*, 2005. **105**(7): p. 2677-84.
57. Hermine, O., et al., *Addition of high-dose cytarabine to immunochemotherapy before autologous stem-cell transplantation in patients aged 65 years or younger with mantle cell lymphoma (MCL Younger): a randomised, open-label, phase 3 trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network. Lancet*, 2016. **388**(10044): p. 565-75.
 58. Le Gouill, S., et al., *Rituximab after Autologous Stem-Cell Transplantation in Mantle-Cell Lymphoma. N Engl J Med*, 2017. **377**(13): p. 1250-1260.
 59. Le Gouill, S., et al., *Reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for relapsed/refractory mantle cell lymphoma: a multicenter experience. Ann Oncol*, 2012. **23**(10): p. 2695-703.
 60. Arzneimittel-Kompendium Schweiz. *Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz: Cytosar Solution*. 2017 [cited 2018 09. Januar]; Available from: <https://compendium.ch/mpro/mnr/3901/html/de>.
 61. Gelbert, L.M., et al., *Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. Invest New Drugs*, 2014. **32**(5): p. 825-37.
 62. Aleem, E. and R.J. Arceci, *Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. Front Cell Dev Biol*, 2015. **3**: p. 16.
 63. Choi, Y.J. and L. Anders, *Signaling through cyclin D-dependent kinases. Oncogene*, 2014. **33**(15): p. 1890-903.
 64. Torres-Guzman, R., et al., *Preclinical characterization of abemaciclib in hormone receptor positive breast cancer. Oncotarget*, 2017. **8**(41): p. 69493-69507.
 65. Shapiro, G.I., *Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. J Clin Oncol*, 2006. **24**(11): p. 1770-83.
 66. Shapiro, G., et al., *A first-in-human phase I study of the CDK4/6 inhibitor, LY2835219, for patients with advanced cancer. Journal of Clinical Oncology*, 2013. **31**(15_suppl): p. 2500-2500.
 67. Hamilton, E. and J.R. Infante, *Targeting CDK4/6 in patients with cancer. Cancer Treat Rev*, 2016. **45**: p. 129-38.
 68. Kim, E.S., *Abemaciclib: First Global Approval. Drugs*, 2017. **77**(18): p. 2063-2070.
 69. FDA. *FDA News Release: FDA approves new treatment for certain advanced or metastatic breast cancers*. 2017 [cited 2018 05. Januar]; Available from: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm578071.htm>.
 70. Burger, J.A. and J.J. Buggy, *Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765). Leuk Lymphoma*, 2013. **54**(11): p. 2385-91.
 71. Singh, J., R.C. Petter, and A.F. Kluge, *Targeted covalent drugs of the kinase family. Curr Opin Chem Biol*, 2010. **14**(4): p. 475-80.
 72. Dar, A.C. and K.M. Shokat, *The evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling. Annu Rev Biochem*, 2011. **80**: p. 769-95.
 73. Pan, Z., et al., *Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. ChemMedChem*, 2007. **2**(1): p. 58-61.
 74. Honigberg, L.A., et al., *The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(29): p. 13075-80.

75. Tai, Y.T., et al., *Bruton tyrosine kinase inhibition is a novel therapeutic strategy targeting tumor in the bone marrow microenvironment in multiple myeloma*. *Blood*, 2012. **120**(9): p. 1877-87.
76. de Rooij, M.F., et al., *The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2012. **119**(11): p. 2590-4.
77. Woyach, J.A., et al., *Prolonged lymphocytosis during ibrutinib therapy is associated with distinct molecular characteristics and does not indicate a suboptimal response to therapy*. *Blood*, 2014. **123**(12): p. 1810-7.
78. Advani, R.H., et al., *Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(1): p. 88-94.
79. Wang, M.L., et al., *Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(6): p. 507-16.
80. Dreyling, M., et al., *Ibrutinib versus temsirolimus in patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: an international, randomised, open-label, phase 3 study*. *Lancet*, 2016. **387**(10020): p. 770-8.
81. Herman, S.E., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals*. *Blood*, 2010. **116**(12): p. 2078-88.
82. Lannutti, B.J., et al., *CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability*. *Blood*, 2011. **117**(2): p. 591-4.
83. Fiorcari, S., et al., *The PI3-kinase delta inhibitor idelalisib (GS-1101) targets integrin-mediated adhesion of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell to endothelial and marrow stromal cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e83830.
84. Kahl, B.S., et al., *A phase I study of the PI3Kdelta inhibitor idelalisib in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma (MCL)*. *Blood*, 2014. **123**(22): p. 3398-405.
85. Liu, N., et al., *BAY 80-6946 is a highly selective intravenous PI3K inhibitor with potent p110alpha and p110delta activities in tumor cell lines and xenograft models*. *Mol Cancer Ther*, 2013. **12**(11): p. 2319-30.
86. Dreyling, M., et al., *Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition by Copanlisib in Relapsed or Refractory Indolent Lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2017. **35**(35): p. 3898-3905.
87. Patnaik, A., et al., *First-in-human phase I study of copanlisib (BAY 80-6946), an intravenous pan-class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors and non-Hodgkin's lymphomas*. *Ann Oncol*, 2016. **27**(10): p. 1928-40.
88. Dreyling, M., et al., *Phase II study of copanlisib, a PI3K inhibitor, in relapsed or refractory, indolent or aggressive lymphoma*. *Ann Oncol*, 2017. **28**(9): p. 2169-2178.
89. Markham, A., *Copanlisib: First Global Approval*. *Drugs*, 2017. **77**(18): p. 2057-2062.
90. Stamatopoulos, B., et al., *AMD3100 disrupts the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and a mesenchymal stromal or nurse-like cell-based microenvironment: pre-clinical evidence for its association with chronic lymphocytic leukemia treatments*. *Haematologica*, 2012. **97**(4): p. 608-615.
91. Donzella, G.A., et al., *AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor*. *Nat Med*, 1998. **4**(1): p. 72-7.

92. Liles, W.C., et al., *Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist*. *Blood*, 2003. **102**(8): p. 2728-30.
93. DSMZ. *Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*. [cited 2017 17. Dezember]; Available from: <https://www.dsmz.de/about-us.html>.
94. Zamo, A., et al., *Establishment of the MAVER-1 cell line, a model for leukemic and aggressive mantle cell lymphoma*. *Haematologica*, 2006. **91**(1): p. 40-7.
95. Estrov, Z., et al., *Z-138: a new mature B-cell acute lymphoblastic leukemia cell line from a patient with transformed chronic lymphocytic leukemia*. *Leuk Res*, 1998. **22**(4): p. 341-353.
96. Medeiros, L.J., Z. Estrov, and G.Z. Rassidakis, *Z-138 cell line was derived from a patient with blastoid variant mantle cell lymphoma*. *Leuk Res*, 2006. **30**(4): p. 497-501.
97. Rudolph, C., et al., *Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004. **153**(2): p. 144-50.
98. Jeon, H.J., et al., *Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line*. *Br J Haematol*, 1998. **102**(5): p. 1323-6.
99. Lai, R., et al., *Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line, Mino*. *Leuk Res*, 2002. **26**(9): p. 849-55.
100. Sutherland, H.J., et al., *Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells*. *Blood*, 1991. **78**(3): p. 666-72.
101. ATCC. *M2-10B4*. 2016 [cited 2017 17. Dezember]; Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Tissue/Bone_Marrow/CRL-1972.aspx?geo_country=de-characteristics.
102. ATCC. *HS-5*. [cited 2017 17. Dezember]; Available from: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-11882.aspx-characteristics>.
103. Roecklein, B.A. and B. Torok-Storb, *Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes*. *Blood*, 1995. **85**(4): p. 997-1005.
104. Hutter, G., et al., *Use of polymorphisms in the noncoding region of the human mitochondrial genome to identify potential contamination of human leukemia-lymphoma cell lines*. *Hematol J*, 2004. **5**(1): p. 61-68.
105. Larkin, M.A., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. *Bioinformatics*, 2007. **23**(21): p. 2947-8.
106. Body, S., et al., *Cytoplasmic cyclin D1 controls the migration and invasiveness of mantle lymphoma cells*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 13946.
107. Beckman Coulter Inc. *Automated viability solutions: Vi-Cell Series Cell Viability Analyzers*. 2004 [cited 2017 18. Dezember]; Available from: http://www.beckmancoulter.de/beckman2_media/Life+Sciences/Produkte/Instrumente/Durchflusszytometrie/Zell+Analyser/Zell+Analyser/Vi_CELL+XR/Broschuh%C3%BCren/Vi_CELL+XR+Broschuh%C3%BCre.pdf.
108. Irrgang, P., *Molekulare Therapie des Mantelzelllymphoms - Einfluss des Tumormicroenvironments auf Inhibitoren des B-Zell-Rezeptor- und des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges*, in *Medizinische Klinik und Poliklinik III - Großhadern*. 2015, Ludwig-Maximilians-Universität München.
109. Fischer, L., *Zielgerichtete Therapien beim Mantelzelllymphom - Der neue CDK4/6-Inhibitor Abemaciclib in Mono- und Kombinationstherapie*, in

- Medizinische Klinik und Poliklinik III - Großhadern*. 2018, Ludwig-Maximilians-Universität München.
110. Miltenyi Biotec GmbH, *Anti Feeder Antibodies mouse*. 2010.
 111. Promega Corporation, *Technical Manual: One-Glo Luciferase Assay System*. 2016.
 112. Miltenyi Biotec GmbH. *MACS Cell Separation*. 2017 [cited 2017 22. Dezember]; Available from: <http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macs-cell-separation.aspx>.
 113. Roche Diagnostics GmbH. *complete Lysis-M, EDTA-free*. 2006 [cited 2017 22. Dezember]; Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/04719964001bul.pdf>.
 114. Machery-Nagel. *Genomic DNA from Blood - Genomic DNA purification with NucleoSpin Blood QuickPure*. 2016 [cited 2017 23. Dezember]; Available from: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Genomic DNA/UM_gDNABlood.pdf.
 115. Quiagen Group. *QIAquick Gel Extraction Kit*. 2015 [cited 2017 27. Dezember]; Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=f4ba2d24-8218-452c-ad6f-1b6f43194425&lang=en>.
 116. Zoellner, A.K., et al., *Temsirolimus acts as additive with bendamustine in aggressive lymphoma*. *Ann Hematol*, 2016. **95**(3): p. 403-7.
 117. Webb, J., *Effect of more than one inhibitor. Enzymes and metabolic inhibitors. Vol. 1*. 1963, New York: Academic Press.
 118. Boldin, M.P., et al., *Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death*. *Cell*, 1996. **85**(6): p. 803-15.
 119. Lazebnik, Y.A., et al., *Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE*. *Nature*, 1994. **371**(6495): p. 346-7.
 120. Fernandes-Alnemri, T., G. Litwack, and E.S. Alnemri, *CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(49): p. 30761-4.
 121. Dreyling, M., et al., *Treatment for patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma: European-based recommendations*. *Leuk Lymphoma*, 2017: p. 1-15.
 122. Seiffert, M., et al., *Efficient nucleofection of primary human B cells and B-CLL cells induces apoptosis, which depends on the microenvironment and on the structure of transfected nucleic acids*. *Leukemia*, 2007. **21**(9): p. 1977-83.
 123. Simon-Gabriel, C.P., et al., *Microenvironmental stromal cells abrogate NF-kappaB inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia*. *Haematologica*, 2018. **103**(1): p. 136-147.
 124. Zhao, X., et al., *Unification of de novo and acquired ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 14920.
 125. Jacobson, C., et al., *HSP90 inhibition overcomes ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma*. *Blood*, 2016. **128**(21): p. 2517-2526.
 126. Kosovec, J.E., et al., *CDK4/6 dual inhibitor abemaciclib demonstrates compelling preclinical activity against esophageal adenocarcinoma: a novel therapeutic option for a deadly disease*. *Oncotarget*, 2017. **8**(59): p. 100421-100432.
 127. Sanchez-Martinez, C., et al., *Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015. **25**(17): p. 3420-35.

128. Sathe, A., et al., *CDK4/6 Inhibition Controls Proliferation of Bladder Cancer and Transcription of RB1*. J Urol, 2016. **195**(3): p. 771-9.
129. Balakrishnan, K., et al., *Regulation of Mcl-1 expression in context to bone marrow stromal microenvironment in chronic lymphocytic leukemia*. Neoplasia, 2014. **16**(12): p. 1036-1046.
130. Chiron, D., et al., *Biological rationale for sequential targeting of Bruton tyrosine kinase and Bcl-2 to overcome CD40-induced ABT-199 resistance in mantle cell lymphoma*. Oncotarget, 2015. **6**(11): p. 8750-8759.
131. Cinar, M., et al., *Bruton tyrosine kinase is commonly overexpressed in mantle cell lymphoma and its attenuation by Ibrutinib induces apoptosis*. Leuk Res, 2013. **37**(10): p. 1271-7.
132. Chiron, D., et al., *Cell-cycle reprogramming for PI3K inhibition overrides a relapse-specific C481S BTK mutation revealed by longitudinal functional genomics in mantle cell lymphoma*. Cancer Discov, 2014. **4**(9): p. 1022-1035.
133. Rahal, R., et al., *Pharmacological and genomic profiling identifies NF-kappaB-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma*. Nat Med, 2014. **20**(1): p. 87-92.
134. Woyach, J.A., et al., *Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib*. N Engl J Med, 2014. **370**(24): p. 2286-94.
135. Saba, N.S., et al., *Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF-kappaB activation in mantle cell lymphoma*. Blood, 2016. **128**(1): p. 82-92.
136. Mohanty, A., et al., *CCND1 mutations increase protein stability and promote ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma*. Oncotarget, 2016. **7**(45): p. 73558-73572.
137. Chiron, D., et al., *Induction of prolonged early G1 arrest by CDK4/CDK6 inhibition reprograms lymphoma cells for durable PI3Kdelta inhibition through PIK3IP1*. Cell Cycle, 2013. **12**(12): p. 1892-900.
138. Seiler, T., G. Hutter, and M. Dreyling, *The Emerging Role of PI3K Inhibitors in the Treatment of Hematological Malignancies: Preclinical Data and Clinical Progress to Date*. Drugs, 2016. **76**(6): p. 639-46.
139. Paul, J., et al., *Simultaneous Inhibition of PI3Kdelta and PI3Kalpha Induces ABC-DLBCL Regression by Blocking BCR-Dependent and -Independent Activation of NF-kappaB and AKT*. Cancer Cell, 2017. **31**(1): p. 64-78.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Dreyling und Frau Dr. Grit Hutter für die Überlassung des Themas meiner Dissertation sowie die hervorragende Betreuung und Unterstützung.

Meinen Doktorandenkollegen Bianca Freysoldt und Luca Fischer danke ich für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor und die gegenseitige Unterstützung bei unseren Projekten.

Ebenso gilt mein Dank den technischen Assistenten Yvonne Zimmermann und Sebastian Tschuri für die Unterstützung bei allen Fragen zu den Experimenten.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern des Labors für experimentelle Leukämie- und Lymphomforschung für ihre Unterstützung bedanken.

Mein persönlicher Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie, meinen Freunden und meiner Freundin Magdalena, die mir während des Studiums zur Seite gestanden sind und mich immer unterstützen.

Eidesstattliche Versicherung

Irger, Markus Richard

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

Molekular gezielte Therapiestrategien beim Mantelzelllymphom
Unter besonderer Berücksichtigung des B-Zell-Rezeptor-Signalpfades

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

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

Markus Irger

Grassau, den 02.07.2021