

Aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose an normalen
hämatopoetischen Progenitorzellen und an Zellen aus Linien
hämatopoetischer Malignome unter dem Einfluss von Perifosin und in
Kombination mit neuen Tumorthapeutika

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Robert Dabrowski
aus Lodz

Datum der Promotion: 21.06.2020

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in

Schmidt-Hieber M, Dabrowski R, Aicher B, Lohneis P, Busse A, Tietze-Buerger C, Reufi B, Thiel E, Blau IW. *In vitro* effects of perifosine, bortezomib and lenalidomide against hematopoietic progenitor cells from healthy donors. Invest New Drugs. 2012 Aug; 30(4):1396-403.

Schmidt-Hieber M, Dabrowski R, Weimann A, Aicher B, Lohneis P, Busse A, Thiel E, Blau IW. *In vitro* cytotoxicity of the novel antimyeloma agents perifosine, bortezomib and lenalidomide against different cell lines. Invest New Drugs. 2012 Apr; 30(2):480-9.

Diese Arbeit
ist meinem zu früh
verstorbenen Onkel
Dr. med. Jürgen Utech
und allen onkologischen
Patienten gewidmet

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Abstrakt | 1 |
| 2. Einleitung | 3 |
| 2.1 Hämatopoese und hämatopoetische Stammzellen | 3 |
| 2.1.1 Geschichtlicher Hintergrund | 3 |
| 2.1.2 Hämatopoese | 4 |
| 2.1.3 Hämatopoetische Stammzellen | 6 |
| 2.1.4 Krebsstammzellen und Stammzellnische in der Pathogenese maligner hämatopoetischer Erkrankungen | 8 |
| 2.2 Apoptose | 9 |
| 2.3 Überblick der Substanzen | 12 |
| 2.3.1 Perifosin als zielgerichteter Wirkstoff und der Akt-Signalweg | 12 |
| 2.3.1.1 Der Akt-Signalweg | 12 |
| 2.3.1.2 Alkylphospholipide und Perifosin – Überblick und klinischer Einsatz | 15 |
| 2.3.2 Bortezomib | 21 |
| 2.3.3 Lenalidomid | 22 |
| 2.3.4 Adriamycin | 23 |
| 2.4 Ziele der Arbeit | 24 |
| 3. Materialien und Methoden | 25 |
| 3.1 Materialien | 25 |
| 3.2 Medikamente | 25 |
| 3.3 Hämatopoetische Progenitorzellen gesunder Spender und Zellen maligner Zelllinien | 26 |
| 3.4 Zellkultivierung | 28 |
| 3.5 Versuche mit Colony-Forming Units | 29 |
| 3.6 Aufarbeitung des Knochenmarks | 29 |
| 3.7 CD34 ⁺ -Zellselektion | 31 |
| 3.8 Vorbereitung des MethoCult [®] -Mediums | 32 |
| 3.9 Klonogene CFU-Assays (Agarkolonie-Assays) | 33 |
| 3.10 Trypanblaumessungen | 36 |
| 3.11 Durchflusszytometrie | 37 |
| 3.11.1 Grundlagen | 37 |
| 3.11.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen | 39 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.12 | Immunhistochemische Untersuchungen..... | 42 |
| 3.13 | Messungen mit dem Hämatologie-Analysegerät XE-5000 (ACAS)..... | 45 |
| 3.13.1 | Grundlagen..... | 45 |
| 3.13.2 | Untersuchungen mit dem Hämatologie-Analysegerät XE-5000..... | 47 |
| 3.14 | Statistische Analysen..... | 48 |
| 4. | Ergebnisse | 50 |
| 4.1 | Klonogene CFU-Assays..... | 50 |
| 4.2 | Trypanblaumessungen..... | 55 |
| 4.2.1 | Hämatopoetische Progenitorzellen gesunder Spender..... | 55 |
| 4.2.2 | Maligne Zelllinien..... | 55 |
| 4.3 | Durchflusszytometrie..... | 58 |
| 4.3.1 | Hämatopoetische Progenitorzellen gesunder Spender..... | 58 |
| 4.3.2 | Maligne Zelllinien..... | 61 |
| 4.4 | Ergebnisse des Hämatologie-Analysegerätes XE-5000..... | 64 |
| 4.5 | Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen..... | 66 |
| 4.5.1 | Hämatopoetische Progenitorzellen gesunder Spender..... | 66 |
| 4.5.2 | Maligne Zelllinien..... | 67 |
| 5. | Diskussion | 68 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 80 |
| 7. | Eidesstattliche Versicherung | 96 |
| 8. | Anteilerklärung | 97 |
| 9. | Lebenslauf | 98 |
| 10. | Danksagung | 99 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| ACAS | Adaptive Cluster Analysis System |
| Akt | Protein kinase B / serine/threonine-specific protein kinase |
| ALL | Akute lymphatische Leukämie |
| AML | Akute myeloische Leukämie |
| APL | Alkylphospholipide |
| Bad | Bcl-2 antagonist of cell death |
| Bcl-xl | B-cell lymphoma-extra large |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2 |
| Bcl2A1 | Bcl-2 related protein A1 |
| BFU-E | Burst forming unit erythroid |
| BFU-MK | Burst forming unit megacaryocyte |
| Cmax | Maximale erreichbare Plasmakonzentration |
| CD33 | Membranprotein / Oberflächenantigen differenzierter Stammzelllinien |
| CD34 | Membranprotein / Oberflächenantigen hämatopoetischer Stammzellen |
| CD38 | Membranprotein / Oberflächenantigen differenzierter Stammzelllinien |
| CFC | Colony forming cell |
| CFU | Colony forming unit |
| CFU-Baso | Colony forming unit basophil |
| CFU-E | Colony forming unit erythroid |
| CFU-Eo | Colony forming unit eosinophil |
| CFU-G | Colony forming unit granulocyte |
| CFU-GEMM | Colony forming unit granulocyte erythroid megakaryocyte macrophage |
| CFU-GM | Colony forming unit granulocyte macrophage |
| CFU-M | Colony forming unit macrophage |
| CFU-MK | Colony forming unit megakaryocyte |
| CI | Combination index |
| CLL | Chronische lymphatische Leukämie |
| CLP | Common lymphoid progenitor |
| CML | Chronische myeloische Leukämie |
| CMP | Common myeloid progenitor |
| CSC | Cancer stem cell |
| DC | Direct current |

| | |
|--|--|
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DOHH-2 | B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinie |
| DR | Death receptor |
| EC | Effect concentration |
| Erk | Extracellular signal-regulated protein kinase |
| FA | Fractions affected |
| FACS | Fluorescence-Activated-Cell-Sorter |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| Foxo3 | Forkhead box O3 |
| FU | Fractions unaffected |
| G-CSF | Granulocyte colony stimulating factor |
| GM-CSF | Granulocyte macrophage colony stimulating factor |
| GSK3 | Glycogen synthase kinase 3 |
| HL-60 | AML-Zelllinie |
| HPZ | Hämatopoetische Progenitorzellen |
| IC | Inhibitory concentration |
| IC ₁₀ , IC ₅₀ , IC ₉₀ | Wirkstoffkonzentration <i>in vitro</i> für 10%, 50%, 90% ige Inhibierung |
| IKZF1 | Transkriptionsfaktor Ikaros |
| IKZF3 | Transkriptionsfaktor Aiolos |
| IMI | Immature myeloid information |
| JNK | c-Jun-N-terminale Kinase |
| K562 | Chronisch-Myeloische-Leukämie-Zelllinie |
| Ki-67 | Proliferationsmarker |
| KM | Knochenmark |
| KMH-2 | Hodgkin-Lymphom-Zelllinie |
| KM HPZ | Hämatopoetische Progenitorzellen des Knochenmarks |
| LSC | Lymphoid stem cell / leukemic stem cell |
| LTRC | Long-term repopulating cell |
| M-CSF | Macrophage colony stimulating factor |
| MDS | Myelodysplastisches Syndrom |
| Mini-MACS™ | Minimagnetisch aktiviertes Zellsortierungssystem |
| MM | Multiples Myelom |
| MPP | Multipotential progenitor cell |

| | |
|----------------|--|
| MSC | Myeloid stem cell |
| MTD | Maximal tolerierte Dosierung |
| mTOR | Mammalian target of rapamycin |
| n.t. | Not tested |
| NF- κ B | Nuclear factor kappa B |
| NR | Not reached |
| NSCLC | Non small cell lung carcinoma |
| p53-Protein | Tumorsuppressor, Wächter des Genoms |
| PB HPZ | Hämatopoetische Progenitorzellen des peripheren Blutes |
| PBMZ | Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PE | Phycoerythrin |
| PH | N-terminal pleckstrin homology-Domäne |
| PI | Propiumiodid |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PIP2 | Biphosphat |
| PIP3 | Triphosphat |
| PSC | Pluripotent stem cell |
| PTEN | Phosphate and tensin homolog |
| RCLB | Red cell lysis buffer |
| RF | Radio frequency |
| Rpm | Revolutions per minute |
| RPMI-8226 | Multiples-Myelom-Zelllinie |
| RRMM | Rezidiertes / therapieresistentes Multiples Myelom |
| SD | Standard deviation |
| SNS-032 | Kinase-Inhibitor |
| SZT | Stammzelltransplantation |
| STRC | Short-term repopulating cells |
| TBS | Tris-buffered saline |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TPO | Thrombopoietin |
| U266 | Multiples-Myelom-Zelllinie |

1. Abstrakt

Einleitung: Perifosin ist ein Alkylphospholipid und Inhibitor des in vielen Tumoren aktivierten PI3K/Akt/mTOR Signalweges. Aufgrund seines günstigen Toxizitätsprofils wurde Perifosin in den letzten Jahren im Rahmen von klinischen Studien bezüglich seiner Wirksamkeit gegen verschiedene Krebserkrankungen untersucht. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, größere Einblicke in die *in vitro* Wirkungsweisen von Perifosin, Bortezomib, Lenalidomid und Adriamycin auf hämatopoetische Progenitorzellen gesunder Spender zu erhalten. Ein weiteres Anliegen war es, die *in vitro* Wirkungsweisen sowie Zytotoxizität von Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid als Einzelsubstanzen und in ausgewählten Kombinationen gegenüber Zelllinien, die hämatologisch-malignen Erkrankungen entstammten, zu untersuchen. Es sollten neue Optionen für Behandlungsschemata mit Perifosin für zukünftige klinische Studien angeregt werden.

Methodik: Die Untersuchungen erfolgten an hämatopoetischen Progenitorzellen und malignen Zelllinien unter Einsatz klonogener CFU-Assays, von Trypanblaumessungen (Zellvitalitätsmessungen), Durchflusszytometrie (Apoptosemessungen), immunhistochemischer Verfahren (Caspase-3 und Ki-67) und der IMI-Technik (Hämatologie-Analysegerät XE-5000).

Ergebnisse: Alle Wirkstoffe hemmten die CFU-Bildung. Perifosin inhibierte hauptsächlich CFU-GM, die anderen Wirkstoffe CFU-E. Perifosin in Kombination mit Lenalidomid oder Adriamycin zeigte antagonistische Effekte. Trotz ihrer CFU-hemmenden Wirkung erzeugten Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid bei CD34⁺-selektierten hämatopoetischen Progenitorzellen nur eine moderate Zytotoxizität. Perifosin und Bortezomib zeigten konzentrations- und zeitabhängig bei allen getesteten Zelllinien zytotoxische Wirkungen und wiesen zusammen nach 24 Std. Inkubationszeit Additions- oder Synergieeffekte auf (Kombinationsindizes 1.13-0.22). Die durch Lenalidomid getriggerte Zytotoxizität war bei allen Zelllinien niedrig. Im IMI-Kanal erhöhte Perifosin im Gegensatz zu Bortezomib oder Lenalidomid signifikant die Zellzahl.

Schlussfolgerungen: Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid hemmten *in vitro* das klonogene Potential der hämatopoetischen Progenitorzellen gesunder Spender, obwohl bei Nagetieren Myelopoese-stimulierende Effekte ermittelt worden waren. Daher kann wahrscheinlich der Abschwächung von Neutropenien nach Wirkstoffgabe keine Bedeutung beigemessen werden. Allerdings inhibierten sie das klonogene Potential nur leicht und führten bei klinisch erreichbaren Plasmakonzentrationen zu einem moderaten Funktionsverlust der gewöhnlichen hämatopoetischen Progenitorzellen. Schlussfolgernd kann nach der Behandlung mit diesen Wirkstoffen von einer Beherrschbarkeit der Hämatotoxizität und dem Verbleib funktioneller

hämatopoetischer Progenitorzellen ausgegangen werden. Perifosin und Bortezomib triggerten bei malignen Zelllinien im Gegensatz zu Lenalidomid überwiegend die Zytotoxizität und wirkten hauptsächlich additiv oder synergistisch.

Mit der IMI-Technik könnte eine effektive Methode etabliert werden, um Apoptoseinduktion/-prozesse schneller analysieren und die Zytotoxizität von Wirkstoffen, die überwiegend an der Zellmembran interagieren, genauer untersuchen zu können. Trotz vielversprechender Ergebnisse im Labor und in Phase I/II Studien hat es Perifosin nach negativen Phase III Ergebnissen nicht zum klinischen Einsatz geschafft. Aktuell gibt es nur zwei registrierte klinische Studien. Bei hämatologischen Erkrankungen scheint Perifosin versagt zu haben. Es bleibt abzuwarten, wie sich neuere Alkylphospholipide behaupten.

Abstract

Introduction: Perifosine is an alkylphospholipid that inhibits the in many tumors activated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Perifosine has been subject to clinical studies investigating its efficacy against various cancer types due to its good tolerance. Aiming to gain greater insights into the *in vitro* modes of action of perifosine, bortezomib, lenalidomide and adriamycin on hematopoietic progenitors of healthy donors, further investigation of single substances as well as of their combinations against cell lines derived from hematological-malignant diseases has been conducted. Results could be used for developing new treatment scheme options with perifosine.

Methods: Investigation was performed with hematopoietic progenitors and malignant cell lines using clonogenic CFU assays, trypan blue staining (measurements of cell vitality), flow cytometry (measurements of apoptosis), immunohistochemistry (caspase-3 and Ki-67) and the IMI-technique (hematology analyzer XE-5000).

Results: All agents inhibited CFU formation. However, perifosine hindered primarily CFU-GM, the other agents retarded CFU-E formation. Perifosine combined with lenalidomide or adriamycin demonstrated antagonistic effects and suppressed the formation of CFU. Despite their CFU inhibiting effects perifosine, bortezomib and lenalidomide caused just moderate cytotoxicity using CD34⁺-selected hematopoietic progenitors. Perifosine and bortezomib revealed cytotoxic effects against all tested cell lines depending on concentration and time and jointly generated with combination indices ranging from 1.13 to 0.22 and efficacy rates between 25% and 75% after a 24 hrs incubation period synergy effects. Lenalidomide-induced cytotoxicity was low in all tested cell lines. Perifosine in contrast to bortezomib or lenalidomide increased cell numbers within the IMI-channel significantly.

Conclusions: Perifosin, bortezomib and lenalidomide inhibited *in vitro* the clonogenic hematopoietic progenitor's potential of healthy donors, even though myelopoiesis stimulating effects were previously observed in rodents. However, they inhibited clonogenic potential just slightly and resulted in clinically achievable plasma concentrations with a moderate loss of function of the common hematopoietic progenitors. In conclusion treatment with these agents is associated with controllable hematotoxicity and continuance of functional hematopoietic progenitors. Perifosin and bortezomib triggered with malignant cell lines primarily cytotoxicity and had additive or synergistic effects. Establishment of the IMI-technique could be a method for faster analysis of apoptosis induction/processes in order to investigate the cytotoxicity of agents interacting primarily at cell membranes. Despite promising laboratory and phase I/II study results Perifosine due to negative phase III results hasn't achieved clinical use. Currently there are just two registered clinical trials ongoing. Perifosine seems to have failed with hematologic diseases. Investigation of alkylphospholipids needs to be awaited.

2. Einleitung

2.1 Hämatopoese und hämatopoetische Stammzellen

2.1.1 Geschichtlicher Hintergrund

Der Biologe Ernst Haeckel postulierte 1868 nach seinen Beobachtungen zur Entstehung vielzelliger Organismen aus Einzellern erstmals den Begriff der Stammzelle. Seitdem beschäftigt sich die Forschung kontrovers mit den Begriffen „hämatopoetische Stammzelle“ und „Hämatopoese“. Im Rahmen der Forschung auf dem Gebiet des hämatopoetischen Systems nach einem gemeinsamen Progenitor der unterschiedlichen Blutzelltypen waren die Wissenschaftler in zwei Lager gespalten. Die Unitarier (unter anderem Ernst Neumann, Alexander Maximow, Artur Pappenheim) vertraten die Ansicht, dass sich die Blutzellreihen aus einer postembryonalen hämatopoetischen Stammzelle differenzieren würden. 1868 erklärte Neumann zudem, dass die Hämatopoese hauptsächlich im Knochenmark (KM) stattfinden würde. 1879 konnte Paul Ehrlich als Vertreter der Dualisten mit seiner Färbetechnik unterschiedliche Leukozytenzelllinien identifizieren, sodass die Dualisten der Ansicht waren, dass myeloische und lymphoide Zellen aus mehreren, im hämatopoetischen Gewebe ansässigen Vorläuferzellen entstünden und nicht aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle [1].

Erst in den 1960er Jahren konnte die Sichtweise der Unitarier bezüglich der pluripotenten Stammzelle nachgewiesen werden [2-4]. Unter Einsatz von Stammzellen wurden in den letzten

Jahren zahlreiche Wege der Erforschung der Zelldifferenzierung oder des Gewebserhaltes ermöglicht. Außerdem haben Stammzellen durch ihre Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit hinsichtlich neuartiger Therapieansätze bei genetischen, malignen und degenerativen Erkrankungen großes Entwicklungspotential [5].

2.1.2 Hämatopoese

Das Knochenmark besteht aus hämatopoetischen Zellen und mesenchymalen Stromazellen und stellt den Hauptort der Hämatopoese dar. Im Rahmen der Hämatopoese entstammen alle reifen Blutzelllinien einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle. Dabei wird zwischen zwei Wegen unterschieden. Auf der einen Seite steht die embryonale transiente Hämatopoese, bei der sich überwiegend primitive Erythrozyten und Makrophagen aus nicht-pluripotenten Stammzellen des Dottersacks entwickeln. Auf der anderen Seite befindet sich die definitive, adulte Hämatopoese, bei der sich ausgehend von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen sämtliche reife Blutzelllinien über Vorläuferzwischenstufen ausdifferenzieren. Dabei stellen die Myelopoese und die Lymphopoese zwei wichtige Zweige der adulten Hämatopoese dar [6]. Die Hämatopoese beginnt somit im Dottersack mit zeitweilig kurzfristiger Übernahme durch die Leber. Sie wird dann in Form der definitiven Hämatopoese in KM und Thymus etabliert [7].

Alle ausdifferenzierten hämatopoetischen Zellen der myeloischen und lymphoiden Reihe (Lymphozyten, Erythrozyten, Granulozyten, Makrophagen, Thrombozyten) entstammen einem gemeinsamen Pool grundlegender hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen [6, 8]. Zu diesem Pool gehören die „long-term repopulating cells“ (LTRC), die sich das gesamte menschliche Leben über in alle Blutzelltypen differenzieren können und eine hohe Kapazität zur Selbsterneuerung haben, und die „short-term repopulating cells“ (STRC) mit einer geringeren Selbsterneuerungsfähigkeit, die nur kurze Zeit differenzieren können. Die STRC differenzieren in die „multipotential progenitor cells“ (MPP) / „pluripotent stem cells“ (PSC), welche die Fähigkeit zur pluripotenten Differenzierung besitzen, sich jedoch nicht selbst regenerieren können. Die MPP stehen den oligopotenten Progenitor-/Vorläuferzellen der „common lymphoid progenitor“ (CLP)-/ „lymphoid stem cell“ (LSC)- und der „common myeloid progenitor“ (CMP)-/ „myeloid stem cell“ (MSC)-Linien vor, die wiederum Vorläufer der „colony forming unit“ (CFU)-Zellen sind. Aus den CLPs bilden sich die B- und T-Zellen. Aus den CMPs, auch als „colony forming unit granulocyte erythroid megakaryocyte macrophage“ (CFU-GEMM) bezeichnet, differenzieren sich weitere Progenitorzellen und schlussendlich reife Zellen (Abbildung 1) [6, 8-10].

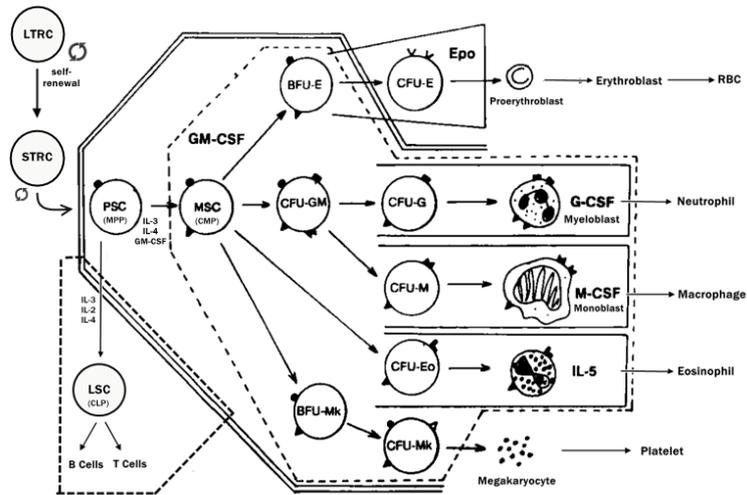


Abbildung 1: Schematische Übersicht der Hämatopoese nach [8] mit eigenständig modifizierten Beschriftungen nach [9] und [10]. (Erläuterungen siehe Text)

Erythropoese, Thrombopoese und Myelopoese beginnen mit der Differenzierung pluripotenter Zellen zu CFU-GEMM-Vorläuferzellen. Bei der Erythropoese entstehen mit Stimulationsfaktoren (u.a. Erythropoetin (EPO), Interleukine) aus den CFU-GEMM über die Zwischenschritte „burst forming unit erythroid“ (BFU-E), „colony forming unit erythroid“ (CFU-E) und Erythroblasten die Erythrozyten. Analog entstehen bei der Thrombopoese unter Einfluss von Interleukinen und Wachstumsfaktoren wie Thrombopoietin (TPO) aus den CFU-GEMM über die „burst forming unit megacaryocyte“ (BFU-MK), „colony forming unit megacaryocyte“ (CFU-MK) und Megakaryozyten die Thrombozyten. Im Rahmen der Myelopoese bilden sich aus CFU-GEMM unter anderem über die Faktoren „granulocyte macrophage colony stimulating factor“ (GM-CSF) und Interleukin-3 (IL-3) die „colony forming unit granulocyte macrophage“ (CFU-GM)-Kolonien, aus welchen wiederum die reiferen CFUs „colony forming unit granulocyte“ (CFU-G), „colony forming unit macrophage“ (CFU-M), „colony forming unit eosinophil“ (CFU-Eo) und „colony forming unit basophil“ (CFU-Baso) entstehen. Schließlich differenzieren sich über weitere Zwischenstufen und Faktorstimulation (u.a. GM-CSF, „macrophage colony stimulating factor“ (M-CSF) sowie „granulocyte colony stimulating factor“ (G-CSF)) Neutrophile, Makrophagen, Eosinophile und Basophile aus. Im Gegensatz zu den oben genannten Reihen bilden sich bei der Lymphopoese aus der pluripotenten Stammzelle über die durch verschiedene Stimulationsfaktoren (Zytokine, Interferone) getriggerte Zwischenstufe der lymphoiden Progenitorzellen die B- und T-Zellen aus (Abbildung 1) [8, 9]. Im Rahmen der Hämatopoese spielen die im KM zu Fibroblasten, Adipozyten, Endothelozyten und Osteoblasten ausdifferenzierten Stromazellen eine interaktive Rolle, indem sie Zytokine und Wachstumsfaktoren bilden und die hämatopoetischen Progenitorzellen (HPZ) stimulieren [6, 8].

2.1.3 Hämatopoetische Stammzellen

Anfang des 19. Jahrhunderts postulierte Maximow, dass alle reifen Blutzellen aus Stammzellen bzw. einer bestimmten Klasse von Progenitorzellen generiert werden [1]. In den 1950er Jahren erfolgten unzählige Versuche zum Nachweis hämatopoetischer Stammzellen. Die Forscher MacCulloch und Till konnten 1961 hämatopoetische pluripotente Stammzellen nachweisen, indem sie Mäusen, die zuvor mit einer letalen Dosis bestrahlt worden waren, KM transplantierten. Dabei zeigte sich die Bildung neuer verschiedener Blutzelltypkolonien in der Milz der Mäuse. Der in diesem Zusammenhang durch Till 1964 entwickelte „Spleen colony forming assay“ bildete die Grundlage für die spätere Identifizierung der einzelnen Blutzelltypen, für die erste Isolierung von hämatopoetischen Stammzellen durch Weissmann und für die Entwicklung methylcellulosehaltiger CFUs, die es ermöglichen, die Proliferation und Differenzierung der HPZ untersuchen zu können [2, 4, 11-13].

HPZ zeichnen sich auf der einen Seite durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und auf der anderen Seite durch die Möglichkeit zur Zelldifferenzierung, ohne dass der Stammzellpool beeinflusst wird, aus. Sie sind durch diese Eigenschaften essentiell für die Entstehung reifer Blutzellen sowie auch für die Aufrechterhaltung der Hämatopoese, da sie lebenslang für eine Regeneration des Blutzellpools sorgen [10, 13-16]. Die meisten Stammzellen befinden sich in der G₀-Ruhephase des Zellzyklus, sodass nur ein kleiner Teil der Stammzellen für die Zelldifferenzierung und somit konsequent für die Homöostase sorgt. Unter anderem schützt dieser Ruhephasestatus die Stammzellen vor Genotoxizität und sichert somit deren dauerhafte Repopulierung [11, 17-19]. Die hämatopoetische Nische bildet die Grundlage für die dauerhafte Aufrechterhaltung bzw. Regulation der Selbsterneuerung, Differenzierung und Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen. Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass hämatopoetische Stammzellen in besonders gefäßreichen endostealen KM-Nischen vorkommen. Diese besonders gefäßreichen Regionen haben bei der Wahrung der Stammzellfunktion eine Schlüsselrolle inne und werden in eine arterielle und eine sinusoidal-megakaryozytäre Nische eingeteilt. In den Nischen befindet sich ein hochkomplexes Netzwerk bzw. Mikromilieu aus Stromazellen differenzierten Zellen in Form von Osteoblasten, Endothelzellen, Fibroblasten, Adipozyten, Schwannschen-, retikulären sowie Nervenzellen. Durch diese Zellen werden verschiedene Wachstums- und Transkriptionsfaktoren ausgeschüttet [7, 20-22]. Für die Stammzellmobilisation und -regulation wichtige Faktoren sind z.B. Zytokine wie Interleukine, G-CSF, TPO, Angiopoietin 1, CXC-Motiv-Chemokin 12 und Tyrosinkinase (Kit)-Liganden. Toll-like Rezeptor Signalwege regulieren die Zellen in Stresssituationen, wie z.B. bei Infektionen durch gesteigerte Granulopoese. Hormonelle Signalwege wie z.B. Parathormon

(PTH) und Prostaglandin E2 (PGE2) übernehmen ebenfalls regulierende Funktionen bei grundlegenden hämatopoetischen Prozessen. Verschiedene Transkriptionsfaktoren spielen während ihrer aktiven Zellzyklusphase eine wichtige Rolle für das Überleben und die Selbsterneuerung der Stammzellen, da sie die Zellprogression und damit die Überlebensfähigkeit steigern. Beispielsweise erhöht eine durch die Proteinkinase B getriggerte Phosphorylierung des Tyrosinkinase (Kit)-Liganden-Stammzellfaktors die Überlebensfähigkeit hämatopoetischer Stammzellen. Ein weiterer Transkriptionsfaktor ist Forkhead box O3 (Foxo3). Dieser Faktor ist dem PI3K-Akt-Signalweg (Beschreibung des Signalweges siehe Kapitel 2.3.1.1) nachgeschaltet und spielt bei der Induktion des Zellzyklusarrestes (G₀-Phase), der Apoptose, der Zelldifferenzierung und im Rahmen der Stressresistenz sowie des Zellmetabolismus eine wichtige Rolle. Ein Foxo3-Defizit bei mit 5-Fluoruracil (5-FU) behandelten und dadurch myelosuppressivem Stress ausgesetzten Mäusen zeigte in Studien eine Verringerung der hämatopoetischen Stammzellen und „colony forming cells“ (CFCs) und reduzierte die Fähigkeit der Stammzellen, die Hämatopoese zu regenerieren. Zellstress aktiviert Kinasen und anschließend die Foxo3-Bildung, sodass über ein negatives Feedback der PI3K-Akt-Signalweg inhibiert wird. Eine Hemmung des Zellwachstums, der Zellteilung und auch die Initiierung der Apoptose können die Folge sein. Ein Verlust der Foxo3-Aktivität resultiert in einer Erschöpfung der Stammzellen und in der Aktivierung des p38-MAPK(mitogen-activated protein kinase)-Signalweges (reguliert Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Apoptose). Weitere wichtige Signaltransduktionswege sind unter anderem die CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4/CXC-Motiv-Chemokin 12-Achse, der Wnt-Signalweg, der Hedgehog-Signalweg sowie der Notch-Signalweg. Alle diese Signalwege sind wesentlich für die Stammzellerhaltung, -differenzierung und -proliferation sowie für die Hämatopoese und Apoptose. Im Falle von malignen hämatologischen Erkrankungen wie z.B. dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder akuten Leukämien legen neuere Daten nahe, dass es durch diese Erkrankungen zu Veränderungen in der Stammzellnische kommt. Diese Erkenntnisse eröffnen neue Forschungsansätze, welche es ermöglichen könnten, die normale Hämatopoese während der zielgerichteten Therapie maligner Klone aufrecht zu erhalten [7, 8, 18, 20-25]. Hämatopoetische Vorläufer- sowie Stammzellen lassen sich durch Oberflächenantigene charakterisieren, wie durch die Entdeckung des Oberflächenantigens CD34 gezeigt werden konnte [11, 26]. CD34 ist ein transmembran gebundenes Glykoprotein, welches von lymphhämatopoetischen Stammzellen, HPZ und Endothelzellen, nicht jedoch von reifen, ausdifferenzierten Zellen exprimiert wird. Es wird als hoch signifikanter Marker für hämatopoetische Stammzellen und für die entsprechenden Progenitorzellen hämatopoetischer Zelllinien genutzt. Fast alle pluripotenten und differenzierten Stammzellen in CFU-Assays

exprimieren das CD34-Oberflächenantigen. CD34⁺-Zellen finden sich unter normalen Bedingungen bei den KM-Zellen mit einer Häufigkeit von 1-2% wieder. 40% aller akuten myeloischen Leukämien (AML) und über 50% der akuten lymphatischen Leukämien (ALL) exprimieren CD34. CD34-Antigene werden in der klinischen Routine zur Stammzellquantifizierung eingesetzt. CD34⁺-Zellen spielen zudem eine bedeutende Rolle bei der Regeneration/Etablierung der Hämatopoese im Rahmen der Stammzelltransplantation (SZT) nach myeloablativen Hochdosistherapien. Pluripotente myeloische Stammzellen sind CD34⁺, CD38⁺ und CD33⁺. CD38 und CD33 sind Antigene der differenzierten Stammzelllinien und werden von hämatopoetischen Stammzellen nicht exprimiert. CD38 übernimmt bei der Regulation von Zellaktivierung und Proliferation wichtige Funktionen und wird von differenzierten hämatopoetischen Stammzellen sowie auch von NK-Zellen, T-Zellen und frühen myeloischen und erythroiden Zellen exprimiert. CD33 wird von myeloischen Stammzellen und Mastzellen exprimiert und wird in der Diagnostik der AML eingesetzt [6, 22, 27-29]. Alle pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen präsentieren das CD34-Antigen, und nur ein kleiner Teil der Stammzellen mit LTR(long-term repopulating)-Fähigkeit besitzt den CD34⁺/CD38⁻-Phänotyp. Diese Zellen kommen normalerweise in einer sehr geringen Anzahl im KM vor (<0.1%). Ihre Zahl nimmt im Falle der KM-Regeneration oder beim Vorliegen einer Erkrankung wie im Rahmen des MDS zu [6].

2.1.4 Krebsstammzellen und Stammzellnische in der Pathogenese maligner hämatopoetischer Erkrankungen

Ein Verlust der normalen LTRC- und STRC-Funktion (Zelldifferenzierung und Selbsterneuerung) und eine fehlerhafte Regulation der Stammzellen in der KM-Nische spiegeln sich zum einen in einer fortschreitenden Zellalterung und zum anderen in der Entstehung verschiedener hämatologischer Erkrankungen, insbesondere von Malignomen, wider. Diese Malignome sind vor allem durch die Fehlregulation der Hämatopoese, Krankheitsprogress durch unkontrollierte Differenzierung, die klonale Proliferation der Progenitorzellen und die verringerte Bildung ausdifferenzierter reifer Blutzellen charakterisiert, sodass auf Basis dieser Beobachtungen die Begriffe „cancer stem cell“ (CSC), „leukemic stem cell“ (LSC) und „cancer stem cell theory“ geprägt wurden [25]. Es wird angenommen, dass Krebsstammzellen Chemotherapien bzw. Radiotherapien „überleben“ und somit die Ursache für die Rezidivneigung der Malignome sind, da die Krebsstammzellen ähnlich wie die normalen hämatopoetischen Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Proliferation bzw. unkontrollierten Teilung in Tochterzellen besitzen und an die nächste Generation weitergegeben werden können. Somit

wirft sich hier auch die problematische Fragestellung auf, wie Krebsstammzellen in der Krebstherapie gezielt bekämpft werden könnten. Die Krebsstammzelltheorie stellt kein gänzlich neues Konzept dar, da sie schon seit Jahrzehnten diskutiert wird. Jedoch ist diese Theorie derzeit neben der Erforschung neuer zielgerichteter Tumorthapeutika in der Krebsforschung ein hochaktuelles Thema, da sie die weiterhin geringen Kenntnisse im Bereich der Krebsentstehung widerspiegelt [25, 30, 31]. Hämatopoetische Krebsstammzellen wurden erstmalig 1997 von Bonnet und Dick isoliert [32]. Weiterhin erfolgte Untersuchungen haben für die AML, die chronische myeloische Leukämie (CML) sowie für das Multiple Myelom (MM) LSC als deren Ursprung nachweisen können [31, 33]. Bei malignen hämatologischen Erkrankungen wie den akuten Leukämien oder dem MM befinden sich die leukämischen Stammzellen überwiegend in der KM-Nische und im Ruhezustand (G_0 -Zellzyklusphase), sodass sie damit vor Apoptose oder gängigen Chemotherapeutika und auch Radiotherapie geschützt sind. Da leukämische Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, stellt der Eingriff mit neuen Tumorthapeutika in die fehlregulierten Signalwege der Stammzellselbsterneuerung oder der Apoptose (z.B. Hedgehog-, Wnt-, Notch- oder PI3K/Akt-Signalweg) einen Hauptangriffspunkt für die Therapie von hämatologischen Erkrankungen bzw. für die Eradikation der leukämischen Stammzellen dar. Jedoch zeigen auch hier Daten präklinischer Studien, in denen die Signalwege als therapeutisches Target bei hämatologischen Erkrankungen wie AML, CML oder dem MM genutzt wurden, die Limitation der Therapie durch Toxizität auf [24, 33].

Da die normale Hämatopoese bei malignen hämatologischen Erkrankungen häufig gestört ist, geht man davon aus, dass hämatopoetische Stammzellen in der KM-Nische durch LSC verdrängt werden und dieses LSC-Mikromilieu entscheidend für die Leukämogenese ist. Daten gegenwärtiger Studien deuten darauf hin, dass das KM-Mikromilieu bei der Initiierung und Progression hämatologischer Erkrankungen wie dem MDS, myeloproliferativen Erkrankungen (u.a. CML) und der AML eine wichtige Rolle einnimmt [20, 21].

2.2 Apoptose

Die Apoptose beschreibt den kontrollierten Zelltod und stand innerhalb des letzten Jahrhunderts insbesondere bezogen auf die häufig komplexe Krebsbiologie im Zentrum intensiver Forschung. Im Rahmen der Apoptose zerbricht die Zelle in membranumhüllte, fragmentierte Apoptosekörperchen, die durch Phagozytose beseitigt werden. Die Freisetzung der Apoptosekörperchen wurde im Griechischen mit dem Ausdruck „apoptosis“ bezeichnet. Er bedeutet „von etwas abfallen“ und assoziiert metaphorisch fallende Herbstblätter laubwechselnder Bäume. Das Entkommen vor der Apoptose ist für das Fortschreiten maligner

Tumore ein notwendiger Schritt und ein Kennzeichen von Tumorzellen [34, 35]. Die Apoptose ist einer der Mechanismen des kontrollierten Zelltodes, der von den Genen bzw. Transkriptionsfaktoren der betroffenen Zelle ausgelöst und über Signalwege reguliert wird. Sie durchläuft einen energieabhängigen, selektiven Prozess, der den Abbau überzähliger oder defekter Zellen steuert. Der Prozess tritt unter physiologischen Bedingungen auf, kann aber auch von diversen Krankheitsbildern ausgelöst werden. In gesundem Gewebe besteht die Hauptaufgabe der Apoptose darin, durch Entfernung der überflüssigen, beschädigten Zellen oder Zellen mit Funktionsstörung die optimale Zellzahl (Homöostase) aufrechtzuerhalten. Die Apoptose kann *in vivo* durch diverse zellschädigende Reize wie endogene Angiogenese-Inhibitoren oder Tumorthérapie ausgelöst werden [36, 37]. Defekte bei der Regulierung des apoptotischen Zelltodes tragen zu vielen Erkrankungen bei. Dazu gehören Störungen, bei denen eine Zellakkumulation auftritt, wie z.B. bei Tumorerkrankungen. Die Erforschung molekularer Apoptosemechanismen gibt Einblicke in die Ursachen zahlreicher Krankheitsbilder wie z.B. neurodegenerativer oder kardialer Erkrankungen oder von Malignomen, bei denen eine unphysiologische Regulation des Zelltodes auftritt [35]. Kennzeichen der Apoptose sind Zellschrumpfung, Chromatinhyperkondensation, „membrane blebbing“ (Bläschenbildung der Membran), DNA-Fragmentierung und Bildung des apoptotischen Körpers. Die Apoptose löst in der Regel keine Immunantwort aus [36, 37].

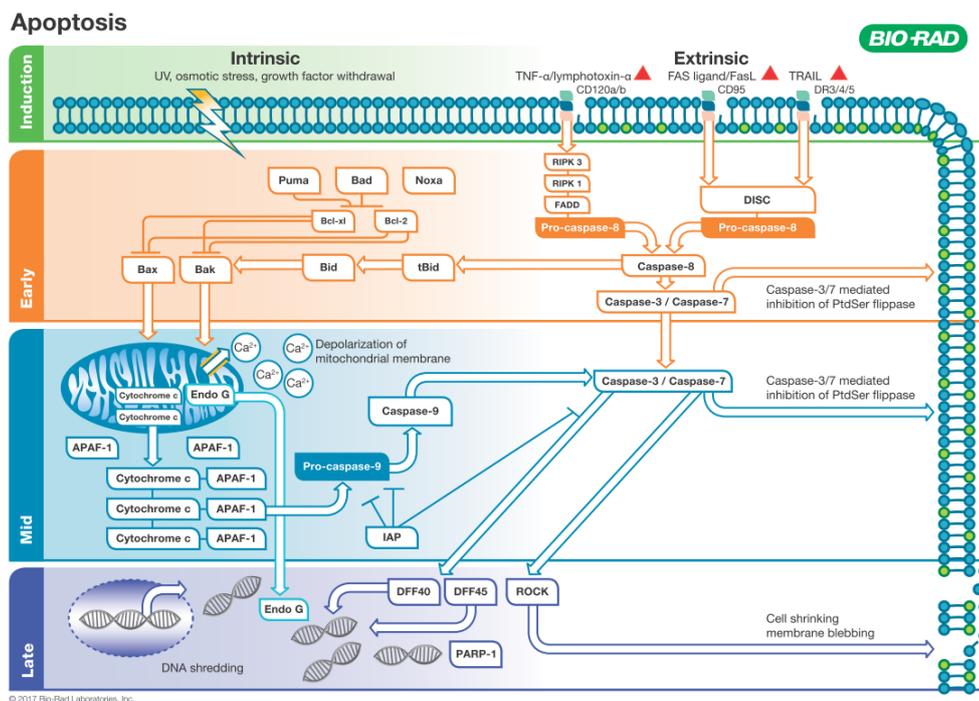


Abbildung 2: Schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges. (Erläuterungen siehe Text). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Bio-Rad Laboratories GmbH (www.bio-rad.com) wiedergegeben

Sie wird entweder durch einen intrinsischen und/oder extrinsischen Signalweg aktiviert (Abbildung 2). In kernhaltigen Zellen wird der intrinsische Apoptose-Signalweg (auch als mitochondrialer Signalweg bezeichnet) von Reizen eingeleitet, welche eine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien anregen und die Initiatorcaspase-9 gewinnen, welche die Effektorcaspase-3 aktiviert und die Apoptose zur Folge hat [36]. Die Aktivierung des intrinsischen Signalweges unterliegt der Kontrolle des Bcl-2-Familienproteins, das weiter in anti-apoptotische Proteine (Bcl-2, Bcl-x1), in pro-apoptotische BH3-only Proteine bzw. sog. Todesagonisten (Bid, Bad, Puma und Noxa) sowie pro-apoptotische Effektorproteine bzw. Bcl-2 assoziierte Antagonisten (Bax und Bak) und die myeloische Zell-Leukämie-Sequenz 1 (Mcl-1 und Bcl2A1) unterteilt werden kann. Unter apoptotischer Reizsetzung (ionisierende Strahlung, zytotoxische Wirkstoffe, Verlust von Wachstumsfaktoren, Zellstress) oder durch regulatorische Signalwege wie den p53-Signalweg (p53-Protein = Tumorsuppressor, „Wächter des Genoms“) werden die BH3-only Proteine hochreguliert und die anti-apoptotischen Bcl-2-Familienproteine herunterreguliert, was zu einer Gleichgewichtsveränderung von pro- versus anti-apoptotischen Proteinen führt. Dieses Ungleichgewicht bewirkt eine Aktivierung der Effektorproteine Bak und Bax, die sich in den Poren der mitochondrialen Membran sammeln und die Membran-Permeabilisierung und Freisetzung des Cytochroms c in das Cytosol auslösen. Die Freisetzung des Cytochroms c führt zur Bildung des Apoptosoms (Proteinkomplex) und zur Aktivierung der Caspase-9 durch proteolytische Spaltung. Die Caspase-9 aktiviert die Caspasen-3 und -7 durch Proteolyse, welche wiederum die eigentliche Apoptose auslösen [35, 38, 39].

Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung extrazellulärer pro-apoptotischer Liganden an die Rezeptoren der Zelloberfläche, die als Todesrezeptoren (DRs) DR4, DR5 und Fas/CD95 (Mitglieder der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-Familie) bekannt sind, getriggert. Dazu gehören CD95, der NGFR (nerve growth factor receptor) und der TNF-bezogene Apoptose-einleitende Ligandenrezeptor (TRAIL). Nach Bindung an den Rezeptor wird ein Tod induzierender Signalkomplex (DISC), der sich aus der Fas/CD95-assoziierten Todesdomäne (FADD) und den Procaspasen-8 und -10 zusammensetzt, gebildet. Es folgt die proteolytische Aktivierung von Caspase-8, die wiederum die Effektorcaspasen-3 und -7 aktiviert und somit den Apoptose-Prozess initiiert. Auf dem extrinsischen Signalweg erfolgt die Herunterregulierung des c-FLIPL (cellular FLICE inhibitory protein long isoform) durch Ubiquitinierung des Lysinrestes (K) 195 [36, 39, 40]. Die Apoptose ist somit eine morphologisch definierte Form des physiologischen Zelltodes, die von einer „Todesmaschinerie“ umgesetzt wird, deren ausführender Arm die Caspasen sind. Der Grundmechanismus der Caspaseaktivierung ist evolutionär angelegt. Die enzymatische Aktivierung der Initiatorcaspasen führt zur

proteolytischen Aktivierung der nachgelagerten Effektorcaspasen und zur Spaltung lebenswichtiger zellulärer Proteine mit der Folge des ordnungsgemäßen Untergangs und der Entfernung der Zelle [41]. Der Krebsentstehung liegt die Dysregulation des Zellzyklus und des intrinsischen Weges der Apoptose mit der Konsequenz zugrunde, dass mutierte Zellen nicht mehr beseitigt und Zellproliferation, Tumorentstehung und -progression begünstigt werden. Es kommt zu unkontrollierten Interaktionen an Zellzyklus-Checkpoints und Störungen der Reparaturmechanismen mit der Folge von DNA-Schäden. Maligne Zellen werden der Antitumorüberwachung durch das Immunsystem entzogen, und es entwickeln sich Resistenzen gegenüber Zytostatika- und Radiotherapie [34, 38, 39]. Die Ergründung von Möglichkeiten zur Wiederherstellung eines fehlregulierten Apoptosemechanismus stellt eine große Herausforderung für die onkologische Therapie dar und bietet erfolgversprechende Zielstrukturen hinsichtlich des Einsatzes neuer Wirkstoffe. Die Resistenzbildung der Tumorzellen gegenüber den neuartigen Substanzen oder die toxischen Nebeneffekte der Therapeutika bleiben zu bewältigen, sodass weitere intensive Forschung notwendig ist [42-44].

2.3 Überblick der Substanzen

Im folgenden Kapitel wird ein Überblick über die in dieser Arbeit eingesetzten Substanzen gegeben, wobei das Alkylphospholipid Perifosin als führend betrachteter Wirkstoff im Zusammenhang mit dem Akt-Signalweg detaillierter beschrieben wird.

2.3.1 Perifosin als zielgerichteter Wirkstoff und der Akt-Signalweg

2.3.1.1 Der Akt-Signalweg

Der PI3K/Akt-Signalweg ist für viele physiologische Prozesse wie z.B. Apoptose, Zellzyklus, Differenzierung, Transkription, Translation und Stoffwechsel essentiell und spielt bei der Signaltransduktion, die an Zelldifferenzierung, -migration, -proliferation und -überleben beteiligt ist, sowie bei der Tumorentstehung und Entwicklung von Resistenzen gegenüber Therapeutika eine zentrale Rolle [45]. Akt wurde erstmals in den 1970er Jahren als retrovirales Onkogen (Akt8) beschrieben, das aus einer Thymom-Zelllinie des Mausstammes AKR isoliert wurde [46]. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die Komplexität des Akt-Signalweges.

Akt wurde in den 1990er Jahren mit dem v-Akt Onkogen nachgewiesen. Die drei durch gleichnamige Gene codierten Akt-Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3 konnten erstmals in Säugetieren identifiziert werden. Die Akt-Struktur setzt sich aus drei Domänen zusammen: der „N-terminal pleckstrin homology“ (PH)-Domäne, die durch Membranlipide wie z.B. PIP2 und PIP3 aktiviert wird und mit diesen interagiert, einer zentralen Kinase-Domäne mit Katalysefunktion, die das regulierende Threonin 308 enthält und aus einer dritten C-terminalen regulatorischen Domäne mit über 40 Aminosäuren und dem regulierenden Serin 473. Durch die Interaktion der PH-Domäne mit den PI3K Produkten PIP3 und PIP2 wird die Akt-Bindung an die Zellmembran getriggert, führt zur Phosphorylierung der Aminosäuren Threonin 308 und Serin 473 und folglich zur Akt-Aktivierung. Nach seiner Aktivierung phosphoryliert Akt verschiedene Substrate (Abbildung 3). Dadurch aktiviert es nahezu 100 verschiedene und komplexe nachgeordnete Signalwege und eine Vielzahl nachfolgender onkogener Signalwege, wie z.B. mTOR. Akt und PI3K stellen somit die Schlüsselemente des Akt-Signalweges dar [46, 49, 51, 52]. Die wichtigsten Konsequenzen der Akt-Aktivierung sind das zelluläre Überleben durch Inhibition der Apoptose-Substrate Bad, Caspase-9 und Foxo sowie die gesteigerte Zellproliferation und Gluconeogenese durch „glycogen synthase kinase 3“ (GSK3)-, p21- und p27-Inhibition und mTOR-Aktivierung (Abbildung 3). Außerdem ist die Hemmung des Transkriptionsfaktors und Tumorsuppressors Foxo und dessen Herunterregulierung in Tumoren ebenfalls ein Akt-Effekt. Akt spielt auch eine wichtige Rolle bei der Regulierung der „nuclear factor kappa B“ (NF- κ B)- abhängigen Gentranskription und darauffolgenden Bildung des Bindungsproteins CREB1 (cAMP response element-binding protein), welches für die Transkription anti-apoptotischer Gene wie Bcl-2 und Mcl-1 notwendig ist [51, 53, 54]. Die Aktivierung des Downstream-Effektors mTOR des PI3K/Akt-Weges führt zu einer gesteigerten Proteinsynthese, vermehrtem Zellwachstum und verstärkter Angiogenese. Hierbei spielen TSC1/2 (tuberous sclerosis complex) als Schlüsselvermittler des mTOR im Rahmen des Zellwachstums bei der Krebsentstehung eine wichtige Rolle [51, 52]. Innerhalb des Akt-Signalweges wurden auch multiple regulierende Rückkopplungsschleifen entdeckt, wie z.B. die mTOR-Komplexe. Die Signalweitergabe durch die aktivierte mTOR-Kinase erfolgt durch zwei verschiedene Komplexe (mTORC1 und mTORC2). Der Rapamycin-empfindliche Komplex mTORC1 gilt als therapeutisches Ziel, da dieser Komplex als Regulator verschiedener Prozesse des Zellwachstums fungiert. Dennoch kann dieser Komplex Akt negativ rückkoppeln. Im Gegensatz dazu hat der Rapamycin-unempfindliche Komplex mTORC2 die Fähigkeit, Akt zu phosphorylieren und zu aktivieren. Folglich kann die Hemmung des mTORs zu einer Aktivierung des Akts führen. Diese Rückkopplungsschleife wird für die Entwicklung von

Resistenzen gegen mTORC1-Inhibitoren als wesentlich angesehen [48, 55]. PTEN zählt als Tumorsuppressorgen zum wichtigsten Regulator des Akt-Signalweges und ist zudem ein Antagonist von PI3K. Bei Malignomen liegt PTEN als mutiertes Gen vor. Ein PTEN-Mangel führt zu einem Anstieg von PI3K-vermittelten Lipiden (PIP3), zur dauerhaften Akt-Aktivierung (vor allem der Akt2-Isoform) und somit zu gesteigerter Zellproliferation und Zellüberleben durch Hemmung der Apoptose. Proteine wie „extracellular signal-regulated protein kinase“ (Erk1/2) und „heat shock protein“ (Hsp 90) regulieren neben anderen Signalwegen auch Akt [49, 51, 54, 56, 57]. Die Überexpression von phosphoryliertem Akt erklärt die Rolle von Akt als Onkogen und ist somit ein Charakteristikum von frühen wie auch späten Tumorstadien und Resistenzen gegenüber Zytostatika- sowie Radiotherapie [51, 53].

2.3.1.2 Alkylphospholipide und Perifosin - Überblick und klinischer Einsatz

Perifosin [Octadecyl-(1,1-Dimethyl-Piperidinio 4-yl)-Phosphat] gehört zur chemischen Gruppe der Alkylphospholipide (APL) und ist ein Inhibitor des in Tumoren häufig aktivierten PI3K/Akt/mTOR Signalweges (Abbildung 4) [55]. APL sind lipidbasierte, strukturell mit Membranlipiden verwandte Wirkstoffe mit einer langen Kohlenwasserstoffkette, durch die sie leicht in die Zellmembran eingebaut und somit auch in dieser angereichert werden können [51]. Dadurch können sie im Gegensatz zur Mehrheit der klassischen chemotherapeutischen Wirkstoffe, welche hauptsächlich die DNA angreifen, durch die Zellmembran hindurch wirken. Da sie von spezifischen cholesterolreichen Mikrodomänen der Zellmembran (sog. Lipid-Rafts), die vermehrt in Tumorzellen vorkommen, aufgenommen werden, reichern sie sich überwiegend in Tumorgewebe an [46, 55, 58, 59].

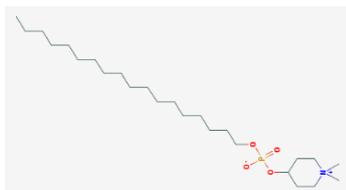


Abbildung 4: Chemische Struktur von Perifosin, chemische Formel: $C_{25}H_{52}NO_4P$. Quelle: PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (abgerufen am 16.12.2018)

APL wurden erstmalig in den frühen 70er Jahren auf struktureller Basis von Lysophosphatidylcholin als potentielle immunmodulatorische Wirkstoffe synthetisiert. Ihr potentieller therapeutischer Nutzen wurde in den 80er und 90er Jahren für die Onkologie entdeckt [45, 55]. Sie bekämpfen Tumorzellen, indem sie einerseits den apoptotischen und nicht-apoptotischen Zelltod einleiten und andererseits indirekt zur Unterbrechung wichtiger Signalübertragungswege führen [51]. Zur ersten Generation der APL gehört z. B. Edelfosin, welches sowohl bei *in vitro* als auch *in vivo* Modellen vielversprechende anti-proliferative

Wirkungen gezeigt hat. Allerdings enthält es ein Glyzeringerüst, das seine Stabilität beeinträchtigt. Infolgedessen waren klinische Ergebnisse enttäuschend, sodass das Einsatzspektrum von Edelfosin limitiert ist. Mit Edelfosin behandelte Zellen zeigen einen deutlichen und schnellen Rückgang des p-Akt Ser473-Niveaus sowie eine Verminderung des Phosphorylierungsniveaus von mTOR (p-mTOR). Sein klinischer Nutzen ist durch die hohe Toxizität eingeschränkt [50, 51, 55]. Bei Miltefosin, einem APL der zweiten Generation, wurde die Stabilität hauptsächlich durch Entfernung des Glyzerinverbindungsstückes erhöht. Diese Verbindung ist *in vitro* gegen verschiedene humane Krebszelllinien aktiv. Sein therapeutisches Potential wurde *in vivo* auch bei Tumor-Xenograft-Modellen bestätigt, jedoch wurde die klinische Applikation von Miltefosin bei oraler Gabe durch gastrointestinale Toxizitäten und bei intravenöser Gabe durch hämolytische Anämien begrenzt. Klinischen Nutzen brachte Miltefosin mit der Zulassung als Impavido[®], einem anti-infektiösen Wirkstoff gegen Leishmaniose, und als Miltex[®] zur lokalen Behandlung von kutanen Metastasen bei Brustkrebspatienten [45, 55, 56]. Aufgrund der Toxizitäten von Miltefosin wurden andere APL-Analoga mit einem verbesserten Nebenwirkungsprofil entwickelt.

Die dritte Generation der APL Perifosin enthält zusätzliche chemische Modifikationen. Bei Perifosin wurde der Cholinanteil durch einen heterozyklischen Stickstoff ersetzt (Abbildung 4). Dadurch zeichnet sich Perifosin als ein Molekül mit metabolischer Stabilität und deutlich reduziertem emetogenem Potential sowie verringerten gastrointestinalen Nebenwirkungen aus. Es zeigt daneben eine bessere anti-proliferative Wirksamkeit als Edelfosin und Miltefosin. Da Perifosin *in vivo* Halbwertszeiten von mehr als sechs Tagen und eine gute Anflutung im Tumorgewebe aufweist, konnten für die orale Gabe klinische Dosierungsschemata mit einem günstigen Nebenwirkungsprofil entwickelt werden. Im Rahmen der Schemata wurde die maximal tolerierte Dosierung (MTD), die beim Menschen eine vertretbare Toxizität (hauptsächlich gastrointestinale Nebenwirkungen) hervorruft, bestimmt. Das günstige Nebenwirkungsprofil von Perifosin ermöglichte dessen Erprobung auch im Rahmen von Kombinationstherapien [45, 51, 55, 60-63]. In der Zelle richtet sich Perifosin gegen verschiedene Zielstrukturen. Eine Hauptwirkung von Perifosin ist die Fähigkeit, die Akt-Phosphorylierung zu hemmen. Dabei interagiert Perifosin mit der PH-Domäne der Akt-Kinase und verhindert die Aufnahme der PH-Domäne in die Zellplasmamembran durch Störung der Membranmikrodomänen bzw. durch Verdrängung der eigentlichen Liganden der PH-Domäne. Infolgedessen wird die Interaktion von Akt mit der Zellmembran und damit seine Phosphorylierung/Aktivierung blockiert. Zellüberleben und -proliferation werden gehemmt und Tumorzellen im Optimalfall durch Induktion der Apoptose sowie auch durch den nicht-

apoptotischen Zelltod eliminiert. Neben Akt hemmt Perifosin die Synthese von Phosphatidylcholin (PC) im endoplasmatischen Retikulum mit der Folge zellulären Stresses, der Induktion des JNK-Signalweges und der Apoptose. Neben verschiedenen Lipidzusammensetzungen sind Lipid Rafts mit signalgebenden Molekülen, zu denen pro-apoptotische Todesrezeptoren gehören, angereichert. Eine Akkumulation von Perifosin in den Lipid Rafts mit Störung der Cholesterinregulation kann im Bereich dieser Mikrodomänen viele Signalprozesse beeinflussen. Beispielsweise mit dem Effekt, dass Perifosin eine Clusterbildung von Fas/CD95 in den Lipid Rafts triggert und somit die Aktivierung des apoptotischen Signalweges auslöst. Bei einigen Zelltypen kann Perifosin den mitogen aktivierten/extrazellulär regulierten, anti-apoptotischen Kinase (Mek-Erk) 1/2 Signalweg herunterregulieren und den pro-apoptotischen JNK-Signalweg aktivieren. Neben der Hemmung des Akt hat Perifosin somit diverse zusätzliche zelluläre Haupt- oder Nebenzielstrukturen [45, 51, 55, 56].

Anfang der 2000er Jahre erlebte Perifosin eine gewisse Renaissance und wurde bis zum heutigen Zeitpunkt im Rahmen von Phase-I/II- und einigen Phase-III-Studien für die Behandlung von soliden Tumoren und hämatologischen Neoplasien als Einzelsubstanz und in Kombination mit anderen Wirkstoffen untersucht. 2003 wurde gezeigt, dass Perifosin das Akt in pharmakologisch relevanten Konzentrationen hemmt und die Translokation von Akt in die Plasmamembran reversibel blockiert [55, 56]. Dieser Wirkmechanismus von Perifosin konnte in vielen Versuchsreihen an Tumorzelllinien von Gliomen, Leukämien, Morbus Waldenström, Kolonkarzinom, neuroendokrinen Tumoren, Lungenkarzinom, Plasmozytom, Prostatakarzinom, Brustkrebs, Endometriumkarzinom sowie Kopf- und Halstumoren bestätigt werden [47, 55, 64-73]. Die aussagekräftigste vorklinische Studie, welche die Anti-Tumor-Wirksamkeit von Perifosin untersuchte, bestätigte, dass Perifosin die Akt-Translokation und damit die Akt-Aktivierung blockiert. Es konnte in den Xenograft-Modellen eine Hemmung von Brust-, Ovarial- und Prostatakarzinomzellen und eine Korrelation zwischen dem Grad der Anti-Tumor-Wirksamkeit und der Akt-Phosphorylierung bzw. -Inhibition gezeigt werden [47]. In Kombination mit Radiotherapie wurde der Einsatz von Perifosin an Prostatakarzinom- oder PECA-Xenograftmodellen untersucht. Obwohl Perifosin bei beiden Ansätzen die Strahlen-induzierte Zytotoxizität auf die Tumorzellen verstärkte, erscheinen in der Literatur keine Angaben bezüglich einer Weiterentwicklung dieser Kombinationstherapie im Rahmen klinischer Studien [74-78]. Bei Leukämien [45, 63, 65-67, 79-81] und Lymphomen [50, 82-86] wurde Perifosin als Einzelsubstanz und auch in Kombination mit anderen Wirkstoffen eingesetzt. Dabei zeigten präklinische Untersuchungen und Phase-I/II-Studien, dass Perifosin gegenüber AML zytotoxische Eigenschaften aufweist. Es induziert in den AML-Blasten durch

Dephosphorylierung von Akt/Erk und Caspaseaktivierung Zytotoxizität, reduziert die klonogene Aktivität der CD34-Zellen von AML-Patienten und AML-Zelllinien und hemmt auch in Kombination mit anderen Wirkstoffen wie dem Kinase-Inhibitor SNS-032 synergistisch [67, 79, 80]. In einer anderen Versuchsreihe zeigte Perifosin in Kombination mit dem UCN-01 Kinase-Inhibitor bei der AML jedoch keine signifikante klinische Wirksamkeit [63]. Insgesamt liegen nur wenige Daten zum klinischen Einsatz von Perifosin bei Patienten mit Leukämien vor. Bei der CML zeigte eine präklinische Arbeit Resistenzen der CML-Zellen gegenüber Perifosin als Einzelsubstanz [79]. Bei ALL-Versuchsreihen konnten Hinweise auf eine therapeutische Wirksamkeit gefunden werden, da Perifosin bei ALL-Zelllinien durch Caspase-Aktivierung, Bid-Spaltung und Cytochrom c Freisetzung aus Mitochondrien Apoptose induzierte [66, 81]. Bei Lymphomen zeigt sich eine ähnlich begrenzte Datenlage wie bei den Leukämien. Dennoch belegen Versuchsreihen, dass Perifosin vor allem in Kombination mit anderen Wirkstoffen wie z.B. mit dem Kinase-Inhibitor Sorafenib bei Lymphomen eine antiproliferative, pro-apoptotische und antiangiogenetische Wirkung erzielen kann [50, 82-86].

Erste klinische Erfahrungen in Phase-I-Studien wiesen für Perifosin ein relativ günstiges Toxizitätsprofil mit fehlender oder geringer Hämatotoxizität nach, bevor eine dosislimitierende gastrointestinale Toxizität einsetzte [87]. Diese Besonderheit wurde in den nachfolgenden Phase-II/III-Studien bestätigt. Perifosin ist jedoch in Bezug auf seine Zytotoxizität gegenüber HPZ und Stammzellen unzureichend charakterisiert. Der Einfluss von Perifosin auf hämatopoetische Stammzellen und Krebsstammzellen wurde bislang wenig untersucht. Eine Studie aus dem Jahre 2008 beschrieb, dass Perifosin (2 $\mu\text{M/L}$) im Assay die klonogene Aktivität von CD34⁺-Stammzellen bei gesunden Spendern reduziert [67]. Eine andere Arbeit belegte demgegenüber, dass Perifosin (1-20 $\mu\text{M/L}$) bei gesunden Mäusen eine KM-Hyperplasie mit Leukozytose, Thrombozytose, milder Anämie sowie einen Anstieg der CFU-GM induziert [88]. Gegenüber mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) von gesunden Spendern zeigte Perifosin keine Toxizität [68]. Eine weitere Arbeit belegte, dass Perifosin signifikant zytotoxisch wirkt, ohne zytotoxischen Einfluss auf mononukleäre Zellen, CFU-GM, BFU-E oder CFU-GEMM zu haben [89]. Auch gegenüber B- oder T-Lymphozyten von gesunden Spendern zeigte Perifosin keine Zytotoxizität [59].

Perifosin wurde beim MM als Einzelsubstanz und auch in Kombination intensiv erforscht. In präklinischen Arbeiten wurde ermittelt, dass Perifosin bei MM-Zellreihen und Patientenproben Zytotoxizität hervorruft, Arzneimittelresistenzen überwindet und die Wirksamkeit anderer Anti-Myelom-Wirkstoffe verstärkt. Perifosin wirkt an der Zellmembran von MM-Zellen. Neben weiteren Wirkmechanismen von Perifosin wurden insbesondere beim MM die getriggerte

Aktivierung des JNK-Signalweges (c-Jun-NH₂-terminale Kinase-Aktivierung) sowie die Herunterregulierung des Survivins und simultane Hochregulierung der Ausprägung der Todesrezeptoren DR4/DR5 beobachtet. Eine verstärkte Induktion der Zytotoxizität und Apoptose in den MM-Zellen waren die Folge. Insgesamt zeigte Perifosin in den präklinischen Studien zum MM sowie in klinischen Phase-I/II-Versuchsreihen vielversprechende Wirksamkeit. Es verstärkte die zytotoxischen Effekte von Bortezomib, Doxorubicin, Melphalan und Dexamethason, indem es die Apoptose förderte. Diese Versuchsreihen belegten, dass Perifosin entweder in Kombination mit Lenalidomid und Dexamethason oder Bortezomib und Dexamethason beim rezidivierten/therapieresistenten Multiplen Myelom (RRMM) mit einer besseren Response sowie Stabilisierung der Erkrankung bei guter Verträglichkeit wirkte. Die Überlebensdaten klinischer Studien waren sogar bei Patienten, die zuvor mit Bortezomib behandelt wurden und therapieresistent waren, besonders ermutigend. Da die Aktivierung von Akt durch Bortezomib für den Proteasomeninhibitor als Resistenzmechanismus diskutiert wurde, weckte dies die Hoffnung, durch die Perifosin-vermittelte Akt-Inhibition die Sensibilität des Proteasomeninhibitors Bortezomib zu verstärken und möglicherweise Wirkstoffresistenzen zu überwinden. Dies stellt ein gutes Beispiel für eine vernünftige Kombinationsstrategie dar, die neuartige Therapien einbezieht, um den Krankheitsverlauf bei Patienten mit MM zu verbessern [46, 59, 68, 69, 90-94]. Auf Grundlage der vielversprechenden *in vitro* Untersuchungen wurden Studien entwickelt wie beispielsweise eine randomisierte Phase-III-Studie, welche Perifosin plus Bortezomib und Dexamethason versus Bortezomib und Dexamethason bei Patienten mit RRMM, die zuvor mit Bortezomib behandelt wurden, verglich. Als primärer Endpunkt wurde in dieser Studie das progressionsfreie Überleben festgelegt. Bedauerlicherweise hat es diese Studie in jüngster Zeit nicht geschafft, bei niedrig dosierten Perifosinschemata eine klinische Wirksamkeit zu belegen, sodass sie auf Grundlage des Ergebnisses der vorläufigen Interimsanalyse abgebrochen wurde [93, 95]. Perifosin wurde bei soliden Neoplasien in vielen klinischen Studien als Einzelwirkstoff eingesetzt und zeigte teils vielversprechende, teils enttäuschende Ergebnisse. Beim Nierenzellkarzinom bewies Perifosin eine klare klinische Wirksamkeit. Jedoch ist es den gegenwärtig verfügbaren Wirkstoffen nicht überlegen und sein klinisches Potential als Einzelwirkstoff fraglich. Unter der Voraussetzung, dass Wirksamkeit und geringe Toxizitäten beobachtet wurden, könnte Perifosin dennoch im Rahmen von Kombinationen mit anderen zielgerichteten Wirkstoffen eine Rolle spielen [96]. Bei klinischen Studien zum metastasierten malignen Melanom, metastasierten Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Pankreaskarzinom, Kopf-Hals-Tumoren und Sarkom wies Perifosin keine signifikante klinische Aktivität auf, sodass weitere Untersuchungen bei diesen Entitäten als

Einzelsubstanz nicht sinnvoll erschienen [74, 97-102]. Auch Ergebnisse von Phase-II-Studien beim kolorektalen Karzinom waren zunächst vielversprechend [103]. Jedoch konnte eine entsprechende klinische Phase-III-Studie bei Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom für Perifosin in Kombination mit Capecitabine ebenfalls keine klinische Wirksamkeit belegen [104]. Dennoch erfolgte eine neue präklinische Versuchsreihe, in welcher Perifosin unter Verwendung vier verschiedener Kolorektalkarzinomzelllinien mit den SMI-Wirkstoffen (Small-Molecule-Kinase-Inhibitoren) Vemurafenib, Trametinib und Regorafenib kombiniert wurde. Im Falle von Perifosin zeigten drei Zellreihen dem Wirkstoff gegenüber eine mittlere bis hohe Empfindlichkeit, während eine Zellreihe resistent war. Trotz dieses neuen, aussichtsreichen Therapieansatzes wurden bisher keine weiteren klinischen Studien initiiert [105]. In einer Phase-I-Studie bei Patienten mit rezidivierenden oder therapieresistenten pädiatrischen ZNS Tumoren und anderen pädiatrischen soliden Tumoren war der Einsatz von Perifosin mit einem akzeptablen Nebenwirkungsprofil erfolgsversprechend [48]. Daraufhin wurde im Rahmen einer der ersten Studien zu Perifosin als Monotherapie bei Kindern mit Neuroblastom die Behandlung ähnlich wie bei Erwachsenenstudien gut vertragen, und es trat in normalem Gewebe keine signifikante Toxizität auf. Die klinischen und pharmakokinetischen Erkenntnisse bestätigten eine sichere Dosierung, um bei Kindern therapeutische Serumkonzentrationen von Perifosin zu erreichen. Deshalb stellt die Perifosin-Monotherapie eine sichere und gut verträgliche Behandlung für Kinder mit Neuroblastom dar [106]. Diese klinische Erfahrung und ein breites Spektrum präklinischer Studien sowie aktuellere Daten deuten darauf hin, dass Perifosin in Kombination mit anderen onkologischen Behandlungen einen gewissen Stellenwert einnehmen könnte, um zusätzliche oder synergistische Antitumorwirkungen zu erzielen. Es könnte auch als Behandlungsmöglichkeit nach Abschluss der Standardtherapie als Erhaltungs- oder Rezidivtherapie mit besserem Langzeitüberleben in Betracht gezogen werden [48, 55, 106]. So verstärkte Perifosin die durch NVP-BEZ235 (Dactolisib, PI3K-Inhibitor) ausgelöste Toxizität bei Zellreihen des Mantelzellymphoms [85]. Beim rezidivierten, therapieresistenten Hodgkin-Lymphom (Phase-II-Studie) zeigte die Kombination mit Sorafenib (Protein-Kinase-Inhibitor) vielversprechende Wirkung bei überschaubarer Toxizität [84]. Auch eine Behandlung mit Perifosin in Kombination mit zwei weiteren Akt-Inhibitoren bei ALL-Zelllinien ergab eine größere Wirkungskraft bezüglich der Apoptose [81]. Beim Ovarialkarzinom zeigte Perifosin eine antiproliferative Wirkung gegen Ovarialkarzinomzellen und verstärkte den Cisplatin-induzierten Wachstumsstillstand [107]. In einer weiteren Studie förderte Perifosin die Antitumoraktivität von Paclitaxel bei Ovarialkarzinomzellen [57]. Bei Blasenkarzinomzellen (Kombination mit Sorafenib), Pankreaskarzinomzellen (Kombination mit Gemcitabin) und beim hepatozellulären

Karzinom (Kombination mit Sorafenib) hemmte Perifosin jeweils das Tumorwachstum und erzielte mit dem jeweiligen Kombinationswirkstoff eine synergistische Verstärkung der zytotoxischen Antitumor-Wirkung [108-111]. Jüngste Studien zeigten auch im Rahmen des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC), dass Perifosin in Kombination mit dem neuen Bcl-2 Antagonisten ABT-737 zum einen und auch in Kombination mit Paclitaxel zum anderen synergistische Wachstumshemmungen und Apoptose auslöste. Die kombinierte Wirksamkeit war deutlich höher als bei den Einzelwirkstoffen. Des Weiteren wurde eine neue Wirkungsweise entdeckt: Perifosin reguliert die exogene Ausprägung des Mcl-1 herunter. Dies erklärt den besseren Synergismus und spricht für weitere Untersuchungen in klinischen Studien [113, 114]. Auch beim Pleuramesotheliom konnte ein signifikanter Anstieg der Zelltoxizität gezeigt werden, wenn Mesotheliom-Zellen mit Perifosin in Kombination mit Cisplatin behandelt wurden, jedoch mangelt es an dieser Stelle an weiteren klinischen Studien zur Verifizierung [112]. Die Kombination von Perifosin und Cisplatin bei Kopf-Hals-Tumorzelllinien erbrachte ebenfalls eine synergistisch-zytotoxische Wirkung [115]. Auch beim Glioblastom zeigte die Kombination von C6 (Ceramid) und Perifosin, dass Perifosin das zelluläre Überleben und Wachstum des Glioblastoms hemmt, ohne eine deutliche Apoptose hervorzurufen und C6 bei Glioblastomzellen die Perifosin-induzierten zytotoxischen Wirkungen verstärkt sowie die Perifosin-induzierte Apoptose triggert [116]. Bei Zellen des Ponsglioms zeigten sich ebenfalls synergistische Effekte von Perifosin und Trametinib, einem Mek-Inhibitor [117].

Zusammenfassend führen diese Daten zu der Einschätzung, dass Perifosin als Einzelsubstanz außer bei cerebralen Neoplasien keine überaus große Bedeutung zuzuschreiben ist [48, 106]. Jedoch hat Perifosin seine Wirksamkeit in Kombination mit anderen Wirkstoffen trotz der negativen Phase-III-Studien beim MM und kolorektalen Karzinom unter Beweis gestellt, denn in den dazugehörigen Phase-I/II-Studien hatten vielversprechende Daten vorgelegen [55, 95, 104].

2.3.2 Bortezomib

Bortezomib (Velcade[®]) gehört zur ersten Generation der Proteasomeninhibitoren und war der erste klinisch erfolgreich angewandte Proteasomeninhibitor im Rahmen der Behandlung des MM und des Mantelzelllymphoms. Bortezomib wurde zunächst im Jahr 2003 in den USA zur Behandlung des RRMM zugelassen. Die europäische Zulassung folgte kurz darauf im Jahr 2004. Später wurde die europäische Indikation im Rahmen der Primärtherapie des MM ausgeweitet. Seit 2013 ist Bortezomib in Kombination mit Dexamethason (VD), mit oder ohne Thalidomid (VTD) in der Erstlinientherapie für den Einsatz als Induktionstherapie bei Patienten, die für SZT geeignet sind und seit 2008 in Kombination mit Melphalan und Prednison (VMP) bei Patienten,

die nicht für SZT geeignet sind, zugelassen. In der Rezidivtherapie des MM ist Bortezomib als Monotherapie, in Kombination mit pegyliertem liposomalem Doxorubicin (V+PLD) oder mit Dexamethason (VD) zugelassen. In den letzten 12 Jahren ist Bortezomib bei der MM-Therapie eine tragende Säule geworden und hat die goldene Ära der Entwicklung neuer Therapeutika mitgeprägt [92, 118-120]. Proteasomen kommen im Zytoplasma und im Zellkern gesunder und auch maligner Zellen vor und fungieren als katalytische Enzymkomplexe. Sie sind an der Regulation von Signalproteinen, die für Zellwachstum, -differenzierung, -zykluskontrolle und Apoptose wichtig sind, beteiligt. Das 26S-Proteasom ist der wichtigste Vertreter, da es ubiquitinierte Proteine reguliert und kontrolliert abbaut (sog. Ubiquitin-Proteasom-Signalweg/System). Eine vermehrte Aktivität des Proteasoms und dadurch erhöhte Zellzyklusaktivität steht mit einer Tumorphiliferation sowie auch maligner Transformation hämatopoetischer Zellen in Zusammenhang. Bortezomib ist eine modifizierte Dipeptidylborsäure, die sich an das 26S-Proteasom bindet und somit den Proteinabbau und Signalwege in der Tumorzelle hemmt, sodass Tumorstwachstum und Angiogenese blockiert werden und die Apoptose durch Hemmung des NF- κ B induziert wird [120-122]. Eine Therapie mit Bortezomib kann durch Nebenwirkungen wie vor allem Neuropathie und durch Resistenzen limitiert sein, sodass die Entwicklung besserer Proteasomeninhibitoren sowie die Erforschung von Kombinationsmöglichkeiten von Bortezomib mit Substanzen anderer Wirkstoffklassen mit dem Ziel der Überwindung der Bortezomibresistenz im Fokus stehen. So hat die Zulassung von Bortezomib als Subkutangabe die Inzidenzrate peripherer Neuropathien verringert. Die erst kürzlich zugelassenen Proteasomeninhibitoren der zweiten Generation Carfilzomib und Ixazomib zeigten nach vorheriger Bortezomibtherapie beim RRMM gute Wirkungen. Weitere Substanzen, wie z.B. das intravenös verabreichte Marizomib und das oral verabreichte Oprozomib befinden sich in der klinischen Entwicklung und zeigen vielversprechende Ergebnisse [92, 118, 119, 123].

2.3.3 Lenalidomid

Lenalidomid (Revlimid®) ist ein oraler immunmodulatorischer Wirkstoff der zweiten Generation und ein 4-Amino-Glutaramid-Derivat von Thalidomid, das durch Modifikation des strukturellen Gerüsts von Thalidomid entwickelt wurde, um die immunmodulatorische Wirkstärke zu erhöhen und die dosislimitierende Neuropathie zu verringern. Als Immunmodulator wirkt Lenalidomid sowohl auf zelluläre als auch auf humorale Anteile des Immunsystems. Das Immunsystem hat die Fähigkeit, die Entstehung von Tumorerkrankungen bis zu einem gewissen Grad abzuwehren und Tumorzellen zu eliminieren. Lenalidomid kann verschiedene Komponenten des

Immunsystems modulieren, indem es die Zytokinproduktion einschließlich TNF, Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-12 (IL-12) hemmt und anti-entzündlich wirkt. Es steigert die zytotoxische Anti-Tumor-Immunität, indem die T-Zell-Proliferation, NK-Zellaktivität, Interferon-gamma- und IL-2-Produktion stimuliert werden. Außerdem zeigt es antiangiogene Wirkung durch Beeinflussung von vaskulären und fibroblastischen Wachstumsfaktoren. Beim MDS und MM wirkt Lenalidomid u.a. durch Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges direkt antiproliferativ und pro-apoptotisch [124, 125]. TNF wird von Monozyten und Makrophagen produziert und ist ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort. Eine gesteigerte TNF-Produktion steht im Zusammenhang mit der Entstehung hämatologischer Malignome, der Apoptose von Stammzellen sowie auch mit ineffektiver Hämatopoese beim MDS. Auch beim MM und bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) ist TNF erhöht, sodass die Reduktion von TNF und IL-6 durch Lenalidomid den apoptotischen Effekt auf die Tumorzellen erklären könnte [124]. Lenalidomid wird hauptsächlich in Kombination mit anderen Wirkstoffen erfolgreich beim MM angewendet und führt zu einer deutlichen Verbesserung des progressionsfreien Überlebens sowie auch des Gesamtüberlebens. 2006 erhielt es die Zulassung in Kombination mit Dexamethason beim RRMM und 2015 beim neu diagnostizierten MM zur Erstlinientherapie von Patienten, die sich nicht für eine SZT eigneten. 2015 und 2016 erfolgten die Zulassungen von vier Therapieregimen mit Lenalidomid (jeweils in einer Dreifachkombination). Hierzu gehören Carfilzomib/Dexamethason, Ixazomib/Dexamethason, Elotuzumab/Dexamethason und Daratumumab/Dexamethason. 2017 erfolgte die Zulassung als Erhaltungstherapie nach SZT. Für die Behandlung des 5-deletierten MDS und des rezidierten/refraktären Mantelzelllymphoms ist es ebenfalls zugelassen [125, 126].

2.3.4 Adriamycin

In den 1950er Jahren wurde bei der Suche nach Tumortheraeutika auf Grundlage von *Streptomyces peucetius* das Antibiotikum Daunorubicin entwickelt, welches bei Maustumoren gute Wirkung zeigte und beim Menschen erfolgreich bei der AML und bei Lymphomen eingesetzt wurde. Allerdings war es von einer enormen Kardiotoxizität geprägt. Doxorubicin (Adriamycin) wurde in den 1970er Jahren als genetische Modifikation von *Streptomyces* mit dem Ziel der Verringerung der Kardiotoxizität entwickelt und erstmals bei Sarkomen eingesetzt. Obwohl Doxorubicin eine hohe therapeutische Wirksamkeit aufweist, schränkt das dosisabhängige Risiko einer Kardiotoxizität den klinischen Einsatz von Doxorubicin weiterhin ein [127-129]. Doxorubicin gehört zur Wirkstoffgruppe der Klasse I Anthrazykline mit einem komplexen Wirkmechanismus und zählt seit über 30 Jahren zu einem der wirksamsten und am

häufigsten angewendeten Tumorthapeutika mit breitem Wirkungsspektrum. Es wird bei soliden (Blase, Brust, Lunge, Ovarien, Sarkome) und hämatologischen (MM, Lymphome, Leukämien) Malignomen in verschiedenen Therapieschemata in Kombination mit anderen Wirkstoffen eingesetzt. Doxorubicin zeigt zytotoxische und antiproliferative Effekte, indem es mit der DNA durch Interkalation interagiert und auf diese Weise die Nukleinsäuresynthese hemmt. Außerdem bindet es an die Enzyme Topoisomerase I und II und hemmt diese mit der Folge, dass der DNA-Doppelhelix-Verschluss nicht erfolgen kann und es zum Stopp des Replikationsprozesses kommt. Aufgrund dieser DNA-Schädigung wird die Apoptose eingeleitet und verschiedene molekulare Signalwege (z.B. Akt, JNK, mTORC1, Bcl-2/Bax) beeinflusst. Die Doxorubicinbehandlung führt des Weiteren zur Bildung von freien Radikalen, welche DNA- und Zellmembranschäden hervorrufen, oder zur Auslösung der Autophagozytose [127, 130]. Um die therapeutische Wirksamkeit von Doxorubicin zu verbessern und die Nebenwirkungsrate zu minimieren, wird aktuell nach neuen Möglichkeiten gesucht. Zum einen können durch Kombination mit anderen Wirkstoffen Resistenzen von Tumorzellen gegenüber Doxorubicin sowie auch die verabreichte Dosis von Doxorubicin und die damit einhergehende Kardiotoxizität verringert werden. Zum anderen führt der Transport in pegylierter Form bzw. an Nanocarriern gebunden zur begünstigten Akkumulation im Tumorgewebe, was die Wirkung verbessern sowie die Toxizität reduzieren kann [127, 128, 130, 131].

2.4 Ziele der Arbeit

Der klinische Einsatz von Perifosin als Einzelsubstanz oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen als Bestandteil des Therapie-Algorithmus bei Patienten mit SZT vor Stammzellapherese mit nachfolgender Hochdosistherapie erschien möglich. Deshalb bestand eines der Ziele dieser Arbeit darin, die Sensitivität von HPZ und Stammzellen gegenüber Perifosin zu untersuchen. Unter Nutzung verschiedener klonogener und nicht-klonogener Ansätze sollte im Rahmen dieser Arbeit die Zytotoxizität der Wirkstoffe Perifosin, Bortezomib, Lenalidomid und zudem Adriamycin als Einzelsubstanzen und auch in ausgewählten Kombinationen bei humanen CD34⁺-HPZ gesunder Spender analysiert werden. Zudem bestand die Hoffnung, weitere Kenntnisse über die *in vitro* Wirkungsweisen der Substanzen auf die CD34⁺-HPZ gesunder Spender zu gewinnen. Darüber hinaus war es ein Anliegen, die *in vitro* Wirkungsweisen und die Zytotoxizität von Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid als Einzelsubstanzen und in ausgewählten Kombinationen gegenüber Zelllinien, die hämatologisch-malignen Erkrankungen entstammten, zu ermitteln. Hierbei bestand die Aussicht, neue Optionen

für Behandlungsschemata mit Perifosin für zukünftige klinische Studien anzuregen. Die geplanten Untersuchungen sollten unter dem Einsatz von klonogenen CFU-Assays, Trypanblaumessungen (Zellvitalitätsmessungen), Durchflusszytometrie (Apoptosemessungen zur genaueren Erfassung der Sensitivität der Progenitorzellen sowie der Zelllinien gegenüber den Wirkstoffen mittels Pancaspase-Assay und Annexin-V-Verfahren) und immunhistochemischen Verfahren (Caspase-3- und Ki-67-Färbung) vorgenommen werden.

Ein weiteres Ziel bestand auch darin, die Effekte unter Einsatz der bisher nicht weit verbreiteten „immature myeloid information“ (IMI)-Technik zu untersuchen. Hypothetisch könnte mit der IMI-Technik eine neue und schnellere Methode etabliert werden, um Apoptoseinduktion/-prozesse nachweisen und beurteilen zu können. Da die IMI-Technik zum Zeitpunkt der geplanten Untersuchungen kaum bei Zellen maligner Zelllinien eingesetzt worden war, hätten aussagekräftige Ergebnisse den Anlass dazu geben können, diese neue Methode in weiteren Studien auf ihre Signifikanz hinsichtlich der Untersuchung apoptotischer Prozesse zu prüfen und einen Vergleich zu bisher etablierten Methoden zu schaffen.

3. Materialien und Methoden

In den folgenden Unterkapiteln werden die Verfahren, welche zur Analyse der *in vitro* Wirkungsweisen von Perifosin, Bortezomib, Lenalidomid und Adriamycin auf HPZ gesunder Spender und auf verschiedene maligne Zelllinien eingesetzt wurden, beschrieben. Die Wirkstoffe wurden sowohl einzeln als auch in Kombination zur Anwendung gebracht.

3.1 Materialien

Die genutzten Geräte, ihre Bezeichnungen und die eingesetzten Materialien (Medien, Zusätze und deren Zusammensetzung, Assays, Gefäße etc.) werden in den jeweiligen Unterkapiteln mit Herstellerangaben und Bezugsquellen aufgeführt. Alle nicht explizit aufgeführten Geräte und Materialien (z.B. Pipetten und Zubehör, sterile Reinraumwerkbänke, Kühlgeräte, Laborkühlschränke, Tiefkühltruhen, Eismaschinen, Schüttler, Laborwaage, Wasserbad, Röhrchenschüttler etc.) sind Ressourcen, die in Forschungslaboratorien üblicherweise eingesetzt werden, den gängigen Standards entsprachen und regelmäßig gewartet wurden.

3.2 Medikamente

Perifosin (D21266) wurde in Form eines in destilliertem Wasser gelösten Trockenpuders zur Verfügung gestellt und in einer Konzentration von 10^{-2} M als Stocklösung (4.6 mg/ml) in

Microtubes (Eppendorf AG, Hamburg) aliquotiert. Es wurde von der Aeterna Zentaris GmbH (Frankfurt/Main) geliefert. Bortezomib (Velcade[®]) wurde von Janssen-Cilag (Neuss) als Lösung bezogen und mit 25%igem Dimethylsulfoxid (DMSO, Biochrom AG Berlin) als Stocklösung in einer Konzentration von 2 µM in Microtubes (Eppendorf AG, Hamburg) eingelagert. Lenalidomid (Revlimid[®]) wurde von Celgene (Celgene Corporation, Summit, NJ, USA) als Trockenpulver bezogen und als Stocklösung (10 mg/ml, 38 mM) in DMSO (Biochrom AG) in Microtubes (Eppendorf AG) aliquotiert. Die hergestellten Medikamentenlösungen (Stocklösungen) wurden bei -40°C als Vorrat gehalten. Vor den Experimenten wurden die Stocklösungen in RPMI-1640 Zellmedium mit Supplementierung von 10% fetalem Kälberserum (FKS), 1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, um eine bakterielle Kontamination von Zellkulturen zu verhindern) und 1% Glutamin (Gibco, Karlsruhe und Biochrom AG) zur Stabilisierung des pH-Wertes bis zur jeweils benötigten Endkonzentration verdünnt. Bei Perifosin und Bortezomib wurden für die Experimente frisch aufgetaute Stocklösungen eingesetzt. Aufgetaute Lenalidomidstocklösungen wurden gemäß Herstellerangaben für maximal zwei Wochen bei 4°C gehalten. Vor den Versuchen wurden die Perifosin-, Bortezomib- und Lenalidomid-Aliquots zur Hydrolysevermeidung 1 Std. lang bei Raumtemperatur gehalten, danach bis zur gewünschten Endkonzentration verdünnt, gut durchmischt und schlussendlich zur Zellsuspension hinzugegeben. Doxorubicinhydrochlorid (Doxo Cell[®]) wurde von der Cell Pharm GmbH (Bad Vilbel) als Lösung (2 mg/ml, $3,4 \times 10^{-3}$ M) zur Verfügung gestellt, bei 4°C in Microtubes (Eppendorf AG) gelagert und unmittelbar vor den Experimenten mit 5%iger Glukoselösung (B. Braun AG, Melsungen) verdünnt. Die eingesetzte, verdünnte Wirkstoffkonzentration bewegte sich bei Perifosin in einem Bereich von 5 µM - 100 µM (in einzelnen Ergebnissen bis max. 120 µM), bei Bortezomib lag sie zwischen 5 nM - 50 nM, bei Lenalidomid zwischen 0.1 µM - 10 µM und bei Adriamycin zwischen 1 nM - 100 nM (in einzelnen Ergebnissen bis max. 160 nM).

3.3 Hämatopoetische Progenitorzellen gesunder Spender und Zellen maligner Zelllinien

Für die Versuche wurden HPZ gesunder Spender genutzt, die zum einen aus dem KM (n=5) und zum anderen aus dem peripheren Blut (n=25) stammten. Die Untersuchungen wurden vom Ethikkomitee der Charité, Campus Benjamin Franklin (Berlin) genehmigt (EA4-091-09). Weiterhin wurden von allen Spendern bezüglich der Probenentnahmen schriftliche Einverständniserklärungen eingeholt. Zur Gewinnung der HPZ wurde ohne vorherige Stimulation unter Lokalanästhesie KM im Bereich des Beckenkammes (Spina iliaca posterior superior) entnommen. Die hämatopoetischen Progenitorzellen des peripheren Blutes (PB HPZ)

wurden nach fünftägiger (2 x 5 µg/kg Körpergewicht/Tag) subkutaner Stimulation mit G-CSF (Neupogen[®], Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, USA) gewonnen. Das KM wurde üblicherweise innerhalb von 24 Std. nach Punktion verarbeitet. Mononukleäre KM-Zellen wurden durch die Ficoll-Dichtezentrifugation (Biocol[®], Biochrom und Ficoll[®] Paque Plus, GE Healthcare) isoliert und bei einigen CFU-Versuchen ohne vorherige CD34⁺-Zellselektion kultiviert. Progenitorzellen des peripheren Blutes, welche durch Stammzellapherese gewonnen wurden, erhielten entweder keine CD34⁺-Zellselektion (bei einigen CFU-Versuchen und einigen Durchflusszytometrieuntersuchungen) oder es erfolgte eine CD34⁺-Zellselektion (bei einigen CFU-Versuchen, einigen Durchflusszytometrieuntersuchungen, sämtlichen Vitalitätstest mit Trypanblau (Biochrom AG) und allen immunhistochemischen Versuchen). Die CD34⁺-Zellselektion wurde mittels Ficoll-Dichtezentrifugation mit dem Mini-MACS[™]-System (minimagnetisch aktiviertes Zellsortierungssystem, Mini-MACS[™], Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) durchgeführt. Für alle Experimente wurden frisch gesammelte HPZ genutzt, deren Vitalitätsrate vor Inkubation mit den zytotoxischen Agenzien bei allen Experimenten >90% lag. Die Reinheit der CD34⁺-selektierten Progenitorzellen betrug bei allen Versuchen >85%. Die Bestimmung der Vitalität erfolgte mithilfe von Trypanblau. Für Trypanblaufärbungen, Durchflusszytometrie-Proben und immunhistochemische Untersuchungen wurden die HPZ zusammen mit den in RPMI-1640 Zellmedium (Gibco, Biochrom AG) verdünnten zytotoxischen Wirkstoffen bis zu einer Konzentration von 5 x 10⁵ Zellen/ml eingestellt. Danach wurden die Proben bei 37°C in 5% CO₂ 24 oder 48 Std. lang (je nach Versuchsanordnung), CFU-Proben jedoch 14 Tage lang, inkubiert. Die Arbeitsschritte der Zellkulturexperimente erfolgten unter sterilen Bedingungen an Arbeitsplätzen der Sicherheitsstufe S2 (u.a. mikrobiologische Sicherheitswerkbank der Klasse II, entsprechend DIN EN 12469). Die Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig) oder der American Type Culture Collection (ATCC, Baltimore, MD, USA) bezogen. Bei den Versuchen wurden folgende Zelllinien eingesetzt: KMH-2 (Hodgkin-Lymphom-Zelllinie), DOHH-2 (B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinie), HL-60 (AML-Zelllinie), K562 (Chronisch-Myeloische-Leukämie-Zelllinie) und die Multiples-Myelom-Zelllinien RPMI-8226 und U266. Zur Kultivierung wurden die Zelllinien in RPMI-1640 Medium mit 10% FKS, 2% Penicillin/Streptomycin und 2% Glutamin (Gibco) in Zellkulturflaschen (Falcon[™], Thermo Scientific[™] Nunc[™]) umgesetzt. Vor den Versuchen wurden Proben der Zellen in einer Konzentration von 5 x 10⁵ Zellen/ml (ggf. 1 x 10⁶ Zellen/ml) in Wellplatten (Nunc[™] Zellkultur-Multischalen) pipettiert und bei 37°C in 5% CO₂ 24 oder 48 Std. lang mit der in der jeweils geplanten Endkonzentration verdünnten Substanz inkubiert. Die Vitalität der Zellen wurde vor und nach Inkubation durch Trypanblaumessungen

(Hämocytometer, siehe Kapitel 3.10) bestimmt. Versuche wurden durchgeführt, wenn eine Vitalität >90% (im Optimalfall >95%) gemessen wurde. In der Regel wurden nach Inkubation von jeder mit der in der jeweils geplanten Wirkstoffendkonzentration gemischten Zelllinienprobe 20 µl für Trypanblaumessungen, je 200 µl für Durchflusszytometrie- und Adaptive Cluster Analyse System (ACAS)-Messungen und 200 µl für die Immunhistochemie abpipettiert, in „Phosphate Buffered Saline“ (PBS, Dulbecco, Biochrom AG) gewaschen, in Medium überführt (falls nach 24 Std. auch eine 48 Std. Inkubation geplant war) und vor den Versuchen weiter vorbereitet.

3.4 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellen aus den Zelllinien erfolgte in RPMI-1640 Medium mit 10% FKS, 2% Penicillin/Streptomycin und 2% Glutamin (Gibco, Biochrom AG) in Zellkulturflaschen (Falcon™, Thermo Scientific™ Nunc™) bei 37°C in 5% CO₂ als Kulturbedingung. In dieser Zeit fand ein vermehrtes Zellwachstum statt, sodass die Nährstoffe im Medium stärker verbraucht wurden und sich Zellabfallprodukte bildeten. Damit die jeweiligen Zellkulturen langfristig für die Versuche nutzbar waren, mussten sie regelmäßig kontrolliert und passagiert (alle 3-4 Tage Kontrolle von Wachstum und Vitalität) werden. Frisch aufgetaute Zellen wurden frühestens nach 24 Std. mit neuem Medium umgesetzt. Üblicherweise erfolgte die Umsetzung der Zellen alle 72 Std. Ein wichtiges Gütekriterium war die Farbe des Zellmediums. Eine Orangefärbung des RPMI-1640 Mediums (Gibco, Biochrom AG) und eine sichtbare Anreicherung abgestorbener Zellreste am Zellkulturflaschenboden ließen auf ein Absinken des pH-Werts sowie einen Ammoniakanstieg schließen. Für den Mediumwechsel wurden die Flaschen nach Entnahme aus dem Inkubator mit 70%igem alkoholischen Desinfektionsmittel abgewaschen und der Zustand des Mediums sowie der Zellen unter dem Mikroskop begutachtet. Vor dem notwendigen Passagieren (Subkultivierung bzw. Mediumwechsel) wurden unter der sterilen Werkbank ca. je 25 ml neues RPMI-1640 Medium mit 10% FKS, 2% Penicillin/Streptomycin und 2% Glutamin (Gibco, Biochrom AG) in neue Zellkulturflaschen (Falcon™, Thermo Scientific™ Nunc™) vorgelegt. Danach wurden 2 ml des Altmediums (vorzugsweise vom Flaschenboden, da sich die Zellen dort sedimentieren) mit einer sterilen Pasteurpipette (pipetus[®], Hirschmann) abgesaugt und in das neue Gefäß zur besseren Zellverteilung mehrmals auf- und abpipettiert. Anschließend wurden die Kulturgefäße wieder in den Inkubator (37°C in 5% CO₂) zurückgestellt. Vitalität und Zellzahl wurden vor und nach Inkubation durch Trypanblaumessungen (siehe Kapitel 3.10) bestimmt. Vor den Versuchen mussten mindestens eine Zellvitalität von >90% und die geforderte Mindestzellzahl vorliegen.

3.5 Versuche mit Colony-Forming Units

Das folgende Diagramm (Abbildung 5) zeigt die Schritte von der Zellvorbereitung bis zur Herstellung der hämatopoetischen CFU-Assays an HPZ gesunder Spender.

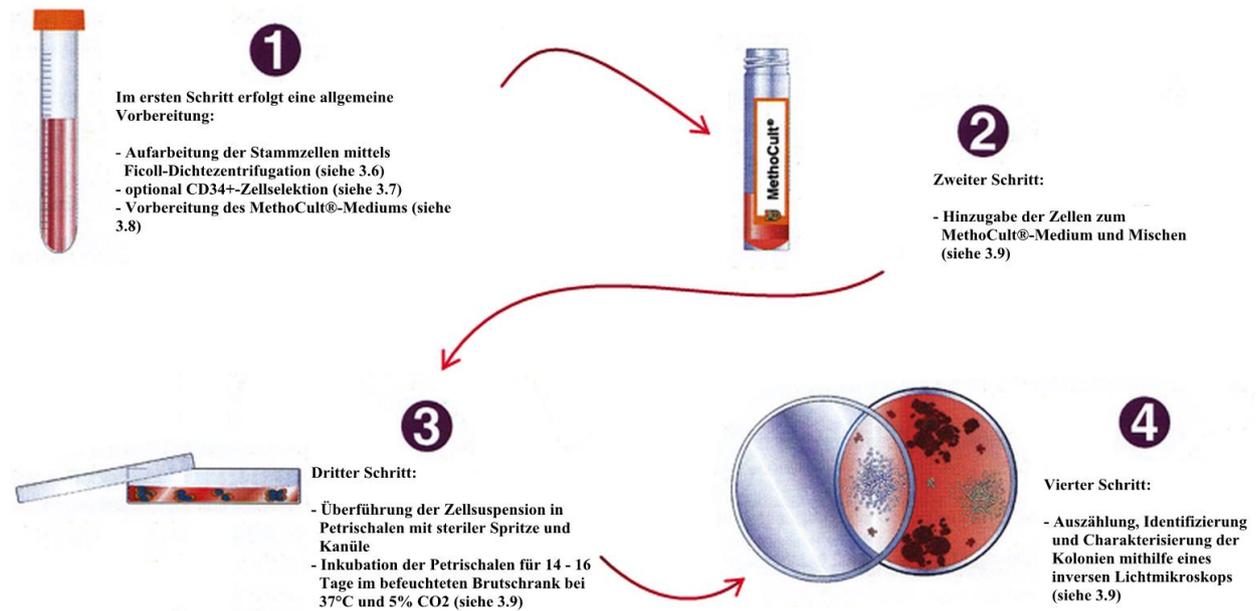


Abbildung 5: CFU-Arbeitsdiagramm (mit freundlicher Genehmigung von StemCell Technologies, Beschreibung der Schritte eigenständig hinzugefügt)

3.6 Aufarbeitung des Knochenmarks

Hämatopoetische Progenitorzellen, die im KM und im peripheren Blut vorkommen, sind Bestandteile der mononukleären Zellfraktion. Sie können durch Ficoll-Dichtezentrifugation (Biocol[®], Biochrom und Ficoll[®] Paque Plus, GE Healthcare) isoliert werden. Im Rahmen der CFU-Assays mit KM-Zellen war eine Aufarbeitung notwendig, da reife Erythrozyten und erythroide Vorläuferzellen sowie auch andere Zellen, welche durch eine Faktorproduktion das CFC-Wachstum beeinflussen, die CFU-Kolonienauszählung hätten verfälschen können. Des Weiteren konnten dadurch die HPZ konzentriert angereichert werden, um eine angemessene Anzahl an Kolonien für eine genaue CFU-Quantifizierung zu gewinnen. Zu Beginn wurde das KM mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Biochrom AG) in einem Verhältnis von 1:3 gemischt (Vortex-Genie 2, Scientific Industries). In einem weiteren Schritt wurden nun in insgesamt zwei aus Polypropylen bestehenden 50 ml konischen Zentrifugenröhrchen (Falcon[™], BD Biosciences) je 15 ml Ficoll gefüllt (Ficoll[®] Paque Plus, GE Healthcare) und je 30 ml KM-Suspension langsam bei leicht gekippten Falconröhrchen zum Ficoll hinzugefügt, sodass eine 2-Phasen-Schichtung sichtbar wurde. Danach erfolgte eine 30 Min. Dichtegradientenzentrifugation (Megafuge 1.0R Thermo Fisher Scientific, Heraeus) bei Raumtemperatur mit 1.460 revolutions per minute (rpm) ohne Bremsfunktion. Durch die Zentrifugation erfolgte eine typische

Aufteilung der KM- bzw. Zellbestandteile in einen mittleren Leukozyten- bzw. Interphasenring. Oberhalb des Interphasenrings befand sich die Serumschicht (aufgrund der geringeren Dichte), unterhalb die Ficollschicht sowie am Boden des Röhrchens aufgrund der höheren Dichte das Sediment (Zellreste, Erythrozytenpellet) (Abbildung 6). Der Interphasenring wurde anschließend mit einer Pasteurpipette oder 5 ml Pipette vorsichtig abgenommen, in ein neues 50 ml Röhrchen (Falcon™, BD Biosciences) überführt, als Waschschrift mit 40 ml PBS (Biochrom AG) aufgefüllt und bei 4°C mit 1.460 rpm und Bremsfunktion 10 Min. lang zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der flüssige Überstand vorsichtig abgekippt. Falls das Pellet noch eine leichte Rotfärbung aufwies (=Hinweis auf im Pellet vorhandene Erythrozyten), wurde dieses optional mit 1.000 µl Red Cell Lysis Buffer (RCLB, G-Biosciences) resuspendiert. Die so entstandene Suspension wurde mit PBS (Biochrom AG) auf 40 ml Röhrchenvolumen aufgefüllt und erneut 10 Min. lang zentrifugiert (4°C, 1.460 rpm, mit Bremsfunktion). Danach wurde der flüssige Überstand erneut vorsichtig abgekippt, das bei nicht mehr sichtbarer Rotfärbung verbliebene Pellet in 1 ml PBS (Biochrom AG) resuspendiert und bis zur Weiterbehandlung bei 4°C gelagert. Bei weiter bestehender Rotfärbung wurde der RCLB-Schritt erneut wiederholt. Zum Schluss erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau (Biochrom AG). Hierfür wurde eine kleine Teilprobe der Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:10 verdünnt und die Zellzahl nach Auslesung mit der Neubauerzählkammer bestimmt (Methode der Zellzahlbestimmung siehe 3.10). Die Probe wurde im Anschluss entweder direkt für die CFU-Kultivierung, Durchflusszytometrie oder Immunhistochemie verarbeitet oder es erfolgte vor der endgültigen Verarbeitung optional eine CD34⁺-Zellselektion.

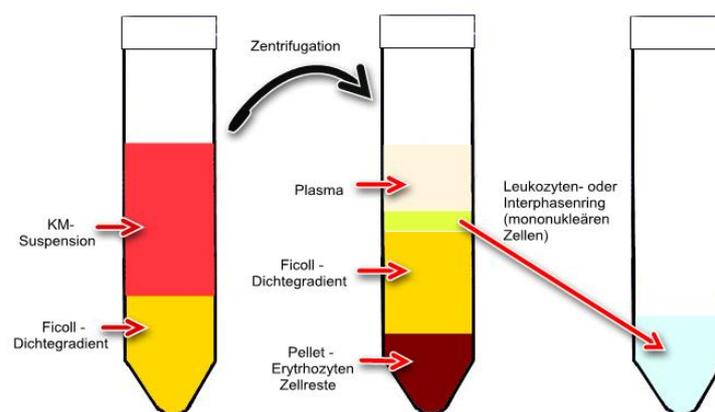


Abbildung 6: Isolation der mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation. Die KM-Suspension wurde über den Ficoll-Dichtegradienten geschichtet und zentrifugiert. Am Gefäßboden bildete sich aufgrund der höheren Dichte das Pellet. Der gebildete Leukozytenring wurde vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und in einem neuen Röhrchen mit Medium resuspendiert. (eigene Darstellung)

3.7 CD34⁺-Zellselektion

Die CD34⁺-Zellselektion erfolgte als Aufreinigung der unter 3.6 gewonnenen Zellsuspension mittels einer immunmagnetischen Säule (minimagnetisch aktiviertes Zellsortierungssystem, Mini-MACS[™], Miltenyi Biotec) und mittels des CD34⁺-MicroBead Kits (CD34⁺-Isolierungskit, Miltenyi Biotec). Das Prinzip beruht auf der Aufreinigung der Zellen mit anti-CD34⁺-Antikörpern, die an Microbeads (magnetische Partikel) gekoppelt sind. Die Zellsuspension durchläuft dabei die immunmagnetische Säule, wobei die durch die Antikörper markierten CD34⁺-Zellen in der Säule verbleiben und die nicht markierten Zellen durch die Säule laufen. Nach Entfernung des Magneten aus der Säule können die CD34⁺-Zellen gesammelt werden (Abbildung 7). Die Aufreinigung erfolgte im Optimalfall mit einer Ausgangsgesamtzellzahl von 10⁸ pro Volumeneinheit (c/ml). Im Vorfeld wurde mit der Neubauerzählkammer die Zellzahl bestimmt. War die Zellzahl höher, so wurden die Reagenzienvolumina entsprechend erhöht. Zuerst wurde die aufgearbeitete Zellpopulation (siehe 3.6) durch ein 30 µm Nylonnetz gefiltert, um Zellklumpen zu entfernen und einer Verstopfung der Säule vorzubeugen. Danach wurden die Zellen mit MACS[®]-Puffer (MACS[®] Running Buffer, Miltenyi Biotec) bestehend aus PBS, BSA (bovines Serumalbumin), EDTA (Ethylendiamintetraacetat) und 0.09% Azid auf 20 ml im Falconröhrchen (Falcon[™], BD Biosciences) aufgefüllt und zentrifugiert (Megafuge 1.0R Thermo Fisher Scientific, Heraeus, 10⁶ / 1.460 rpm / 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Zellpellet in 300 µl MACS[®]-Puffer resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden 100 µl FcR Blocking Reagent (FcR Blocking Reagent, human Miltenyi Biotec) und 100 µl CD34⁺-MicroBeads hinzugegeben, die Suspension gut gemischt und für 30 Min. gekühlt (4-8°C, Kühlschrank). Anschließend wurde die Suspension erneut mit MACS[®]-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt und zentrifugiert (10⁶ / 1.460 rpm / 4°C). Der Überstand wurde dann wieder entfernt und das Zellpellet mit 500 µl MACS[®]-Puffer resuspendiert. Zur magnetischen Trennung der Zellen wurden entweder Mini- oder Midi-Säulen verwendet, die vor Gebrauch gekühlt gelagert wurden. Bei einer totalen Gesamtzellzahl von 1.5 x 10⁸ Zellen wurde die kleine Säule eingesetzt, bei einer Zellzahl ab 2 x 10⁸ die größere. Zuerst wurden die Säulen mit MACS[®]-Puffer gespült (Mini: 500 µl, Midi: 3 ml). Im Anschluss wurde die Zellsuspension langsam in die magnetische Säule pipettiert. Die unmarkierten Zellen durchliefen die Säule und wurden in einem Falconröhrchen aufgefangen. Danach wurde die Säule drei Mal aufeinanderfolgend mit MACS[®]-Puffer gewaschen (Mini: 3 x 500 µl, Midi: 3 x 3 ml). Im letzten Schritt wurde auf die Säule ein neues Falcon-Tube gegeben, der Magnet entfernt, MACS[®]-Puffer (Mini: 1 ml, Midi: 5 ml) auf die Säule pipettiert, die magnetisch markierten Zellen mit einem Druckstück durch die Säule gespült und in PBS (Biochrom AG) resuspendiert.

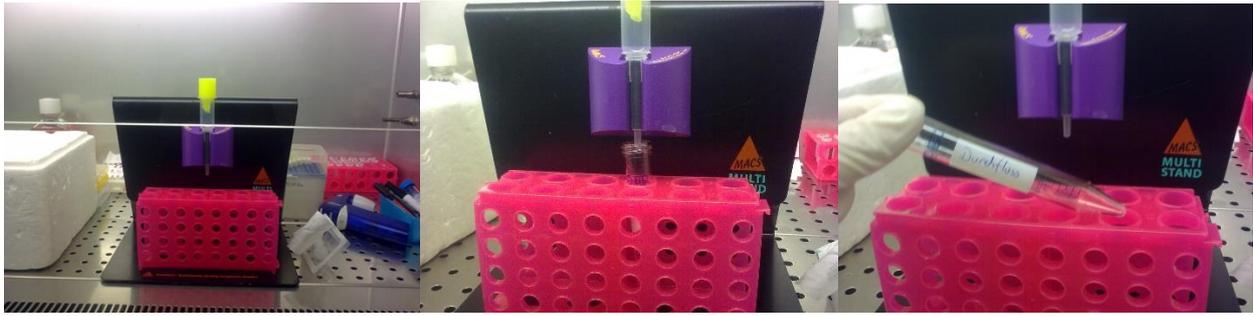


Abbildung 7: Darstellung der Zellselektion. Die magnetisch markierten Zielzellen wurden in der Säule gehalten, während die unmarkierten Zellen durch die Säule flossen. Nach Entfernung des Magneten verloren die markierten Zellen ihren Halt und konnten in einem neuen Röhrchen aufgefangen werden. (eigene Photodokumentation)

Die Zellzahlbestimmung der magnetisch markierten CD34⁺-Zellen erfolgte durch Trypanblauverdünnung (Biochrom AG) im Verhältnis 1:5 mittels Neubauerzählkammer. Die Reinheit sämtlicher CD34⁺-selektierten Progenitorzellen, welche mit der Durchflusszytometrie bestimmt wurde, lag bei >85%. Nach der Zellselektion wurden die CD34⁺-Zellen sofort weiterverarbeitet.

3.8 Vorbereitung des MethoCult®-Mediums

Die Kultivierungs-Assays enthielten ein viskoses/semi-viskoses Nährmedium und Wachstumsfaktoren, welche für Differenzierung und Proliferation der HPZ erforderlich sind. Dadurch wurden Zellteilung und -differenzierung der HPZ und anschließend Bildung und Wachstum von Kolonien reifer Zellen ermöglicht, die dann charakterisiert und ausgezählt werden konnten. Für die Kolonie-Assays wurde als Grundlage ein Methylzellulose-basiertes Medium (MethoCult®, StemCell Technologies Inc.; vorher Terry Fox, Vancouver, BC, Canada) genutzt. Das MethoCult®-Medium (100 ml-Flasche) wurde vor den Untersuchungsansätzen über Nacht bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank (2-8°C) aufgetaut, danach gründlich 60 Sekunden lang geschüttelt und für 5 Min. ruhiggestellt, damit sich eventuell gebildete Bläschen auflösen konnten. Danach wurde das MethoCult®-Medium mithilfe einer sterilen Spritze und 16G-Kanüle (Luer-Lok™ tip syringe, Microlance™ needle 16G, BD) in sterile 14 ml Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH) verteilt. Das MethoCult®-Medium wurde explizit so produziert, dass Zellen im Verhältnis von 1:10 hinzugegeben werden können. Pro 14 ml Röhrchen wurden 3.5 ml MethoCult®-Medium aliquotiert. Nach Verschluss der Röhrchen wurden diese bis zum Versuchsansatz bei -20°C tiefgefroren.

3.9 Klonogene CFU-Assays (Agarkolonie-Assays)

CFU-Assays wurden genutzt, um Informationen über die hämatopoetische Vorläuferzellendifferenzierung und -proliferation zu erhalten. Zudem ermöglichten sie einen Überblick über die Verteilung dieser Zellen im blutbildenden Gewebe und in den gereinigten isolierten Zellpopulationen. Die klonogene Teilungsfähigkeit der HPZ war grundlegend für deren Nachweis im CFU-Assay. Vor Beginn der CFU-Versuche wurde die für jeden Versuch benötigte Anzahl der mit MethoCult[®]-Medium (StemCell Technologies Inc.) befüllten Röhren (Greiner Bio-One GmbH) bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach wurden die HPZ vorbereitet, indem sie in RPMI-1640 Medium mit Supplementierung von 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) und 1% Glutamin (Gibco und Biochrom AG) suspendiert wurden. Hierbei wurden die Zellen bis zum 10-fachen der jeweils benötigten Endkonzentration, die für ein optimales Zellwachstum in der Kulturschale gefordert war, eingestellt. Für Zellen ohne vorherige CD34⁺-Zellselektion wurde eine Endkonzentration von 1.1×10^5 Zellen pro Kulturschale empfohlen, sodass eine Zell- und Mediumsuspension von 1.1×10^6 Zellen pro ml vorbereitet werden musste. Bei CD34⁺-selektierten Zellen wurde eine Endkonzentration von 1.1×10^3 Zellen pro Kulturschale empfohlen, sodass eine Zell- und Mediumsuspension von 1.1×10^4 Zellen pro ml vorbereitet werden musste. In einem weiteren Schritt wurden die für den jeweils im Vorfeld geplanten Versuchsansatz einzusetzenden Medikamente, die in den unter Kapitel 3.2 aufgeführten Stocklösungen eingefroren auf Vorrat lagen, bis zur jeweils erforderlichen Endkonzentration mit dem entsprechenden unter Kapitel 3.2 genannten Medium verdünnt. Im letzten Vorbereitungsschritt wurden 35 mm Zellkulturschalen und 100 mm Petrischalen (Cell Culture Dish[®], Nunc, New York, NY, USA) mit einem wasserfesten Marker beschriftet und nummeriert. Anschließend wurden je 350 µl Zellsuspension zu den mit 3.5 ml MethoCult[®]-Medium befüllten Röhren pipettiert (Eppendorf Research[®] plus, Eppendorf[®] Reference[®], Eppendorf AG), auf dem Vortex (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) gut gemischt und 5 Min. lang stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurden in die 35 mm Zellkulturschälchen 100 µl des in der jeweils geplanten Konzentration befindlichen Wirkstoffes, bei Negativkontrollen (Zellen, denen kein Wirkstoff hinzugegeben wurde) 100 µl des entsprechenden Mediums, vorgelegt. Danach wurde mit einer sterilen Spritze und 16G-Kanüle (Luer-Lok[™] tip syringe, Microlance[™] needle 16G, BD) in jede 35 mm Zellkulturschale je 1 ml der Zell-Methylzellulose-Suspension so aliquotiert, dass die Zellkulturschale mit der viskosen Suspension vollständig und ohne Luftblasenbildung benetzt war und somit in jeder Zellkulturschale ein Gemisch aus 1.1 ml Zell-Methylzellulose-Wirkstoff-Suspension vorlag (bei Negativkontrollen Medium). Um Abweichungen zu

minimieren, wurden je Konzentration und Stammzellspender jeweils 3 Agarplatten („Triplicates“) und zusätzlich eine Negativkontrolle angesetzt. Für jedes neu angefangene Zell-Methylzellulose-Röhrchen wurde eine neue sterile Spritze benutzt. Auf diese Weise wurde jede weitere 35 mm Zellkulturschale befüllt. Danach wurden die 35 mm Schalen in die 100 mm Petrischalen gesetzt (Abbildung 8). Die Schalen wurden anschließend 14 Tage lang im Brutschrank (Kendro Heraeus BB6060CU CO₂ Inkubator) inkubiert (37°C, 5% CO₂-haltige Luft und >95% Luftfeuchtigkeit).

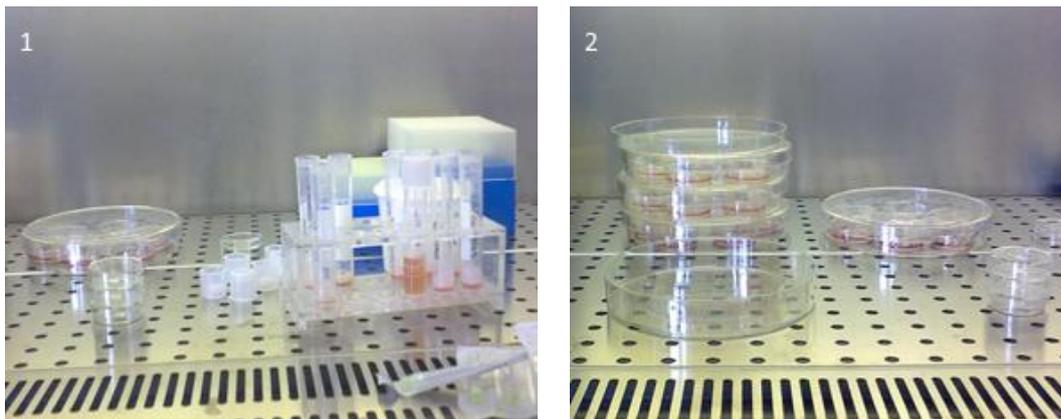


Abbildung 8: 1.) Röhrchen mit Zell-MethoCult® - Suspension; 2.) Fertiggestellte CFU-Assays vor Inkubation (eigene Photodokumentation)

Im darauffolgenden Schritt wurden die CFU-Kolonien (Abbildungen 9-11 zeigen Beispiele für CFU-Kolonien), wie in der Publikation von Volpe und Warren 2003 [132] mit einem inversen Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH) identifiziert, ausgezählt und in einer Excel-Tabelle (Microsoft®) erfasst: CFU-GM, BFU-E, CFU-GEMM und CFU-E. Die zytotoxische Wirkung der Agenzien auf die Progenitorzellen wurde ermittelt, indem die Anzahl der CFUs bei einer bestimmten Wirkstoffkonzentration mit deren Anzahl in der Negativkontrolle verglichen wurde. Für jeden Spender wurde der Mittelwert der Triplicates berechnet, während der Medianwert genutzt wurde, um den IC₁₀- (Wirkstoffkonzentration *in vitro* für 10%ige Inhibierung notwendig), IC₅₀- (Wirkstoffkonzentration *in vitro* für 50%ige Inhibierung notwendig) und den IC₉₀- (Wirkstoffkonzentration *in vitro* für 90%ige Inhibierung notwendig) Wert zu berechnen. Dabei wurden die IC₁₀-, IC₅₀- und IC₉₀- Wirkstoffkonzentrationen als jeweilige Dosis angegeben, die im Vergleich zur Negativkontrolle *in vitro* zu einer 10%igen, 50%igen und 90%igen Hemmung der Gesamt-CFUs führte.

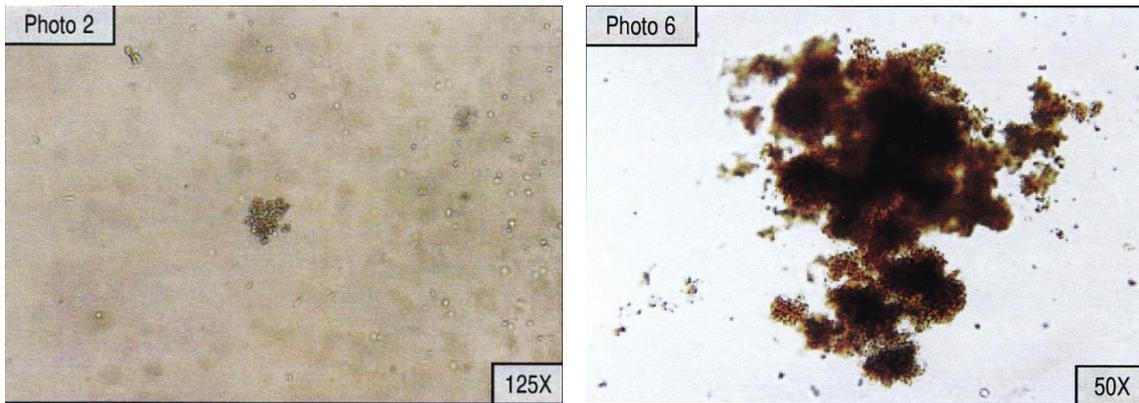


Abbildung 9: Photo 2) CFU-E (Colony forming unit erythroid) als Cluster; Photo 6) BFU-E (Burst forming unit erythroid) aus mehr als 16 Clustern (mit freundlicher Genehmigung von StemCell Technologies)

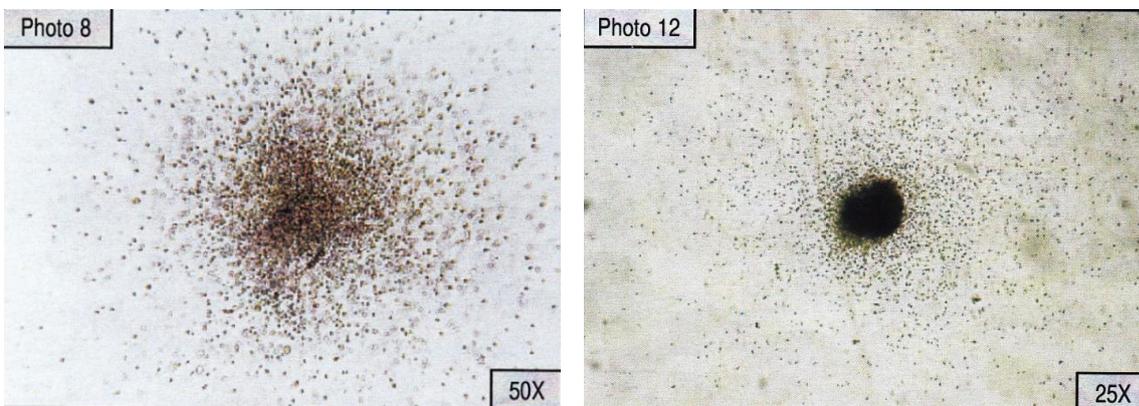


Abbildung 10: Photo 8) CFU-GM Kolonie (Colony forming unit granulocyte macrophage); Photo 12) CFU-GEMM Kolonie (Colony forming unit granulocyte erythroid megakaryocyte macrophage) (mit freundlicher Genehmigung von StemCell Technologies)

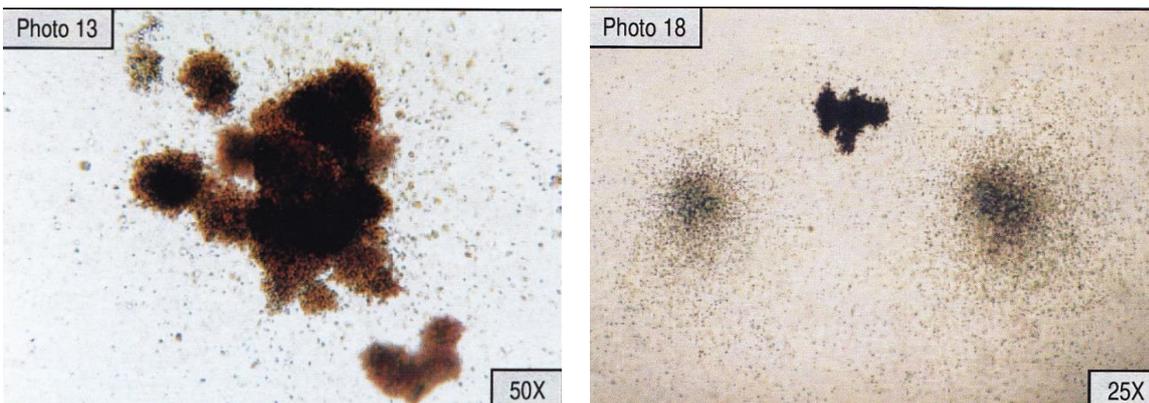


Abbildung 11: Photo 13) CFU-GEMM (Colony forming unit granulocyte erythroid megakaryocyte macrophage) und BFU-E (Burst forming unit erythroid) (rechts unten); Photo 18) CFU-GM (Colony forming unit granulocyte macrophage) (links und rechts), BFU-E (Burst forming unit erythroid) (Mitte) (mit freundlicher Genehmigung von StemCell Technologies)

Folgende CFU-Messungen wurden durchgeführt:

- CFU-Ansätze von Perifosin (n=15), Bortezomib (n=12), Adriamycin (n=5) und Lenalidomid (n=3) als Einzelsubstanzen gegenüber unbehandelten (d.h. ohne CD34⁺-Zellselektion, keine Ficoll-Dichtezentrifugation) peripheren Blutstammzellen („Buffy coat“).

- CFU-Ansätze von Perifosin (n=3), Bortezomib (n=2) und Lenalidomid (n=1) als Einzelsubstanzen gegenüber nicht CD34⁺-selektierten KM-Stammzellen (nach Ficoll-Dichtezentrifugation).
- CFU-Ansätze von Perifosin (n=3) und Bortezomib (n=3) als Einzelsubstanzen gegenüber CD34⁺-selektierten peripheren Blutstammzellen (nach Ficoll-Dichtezentrifugation).
- CFU-Ansätze von Perifosin in Kombination mit Bortezomib (n=4), Adriamycin (n=3) und Lenalidomid (n=3) gegenüber unbehandelten (d.h. ohne CD34⁺-Zellselektion, keine Ficoll-Dichtezentrifugation) peripheren Blutstammzellen („Buffy coat“).

3.10 Trypanblaumessungen

Unter Einsatz von Trypanblau konnte einerseits die Zellzahl bestimmt und andererseits die Vitalitätsrate (Anzahl der lebenden bzw. toten Zellen) ermittelt werden. Vitale Zellen nahmen Trypanblau nicht auf, jedoch nahmen avitale Zellen es auf, färbten sich blau ein und zeigten sich unter dem Mikroskop dunkler als lebende Zellen.

Zellzählung: Es wurden 100 µl der gut durchmischten Zellsuspension in ein neues Tube (Eppendorf AG) aliquotiert und mit acetoxylsäurehaltigem Trypanblau (3% „acetic acid with methylene blue“, StemCell Technologies) in einem Verhältnis von 1:50 gemischt. Die Suspension wurde langsam in beide Kammern des Hämocytometers (Neubauer-Zählkammer) pipettiert, wobei darauf zu achten war, dass die Kammern weder über- noch unterfüllt wurden. Die Zellauszählung erfolgte mit einem Phasenkontrastmikroskop (Kern Optics). Dabei wurden die Zellen der 4 großen Eckquadrate unter Verwendung eines Handstückzählers registriert. Die Zellzahl (Zellen/ml) wurde folgendermaßen berechnet: Durchschnitt der Zellzahl pro Quadrat x Verdünnungsfaktor x 10⁴ = Zellzahl/ml.

Zur Bestimmung der Vitalität wurden 100 µl der gut durchmischten Zellsuspension in ein neues Tube (Eppendorf AG) aliquotiert, danach mit Trypanblau (Biochrom AG) in einem Verhältnis von 1:2 gemischt und in das Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) pipettiert. Unter dem Phasenkontrastmikroskop (Kern Optics) wurden Zellen mit blauvioletter Färbung als tot/defekt identifiziert. Lebende/vitale Zellen waren farblos/klar. Die vitalen und avitalen Zellen der 4 großen Eckquadrate wurden unter Verwendung eines Handstückzählers registriert. Der prozentuale Anteil vitaler Zellen wurde folgendermaßen berechnet: lebende (farblose) Zellen / (lebende (farblose) Zellen + tote (gefärbte) Zellen) x 100.

Im Rahmen von nicht-klonogenen Untersuchungen (Flüssigkulturen) mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.11) wurde die Vitalität der HPZ (ohne und mit CD34⁺-Zellselektion) unter Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen der Substanzen Perifosin,

Bortezomib und Lenalidomid nach 24 Std. und 48 Std. Inkubation im Brutschrank mit der Trypanblaumethode untersucht und ausgewertet (Erfassung der Daten in einer Excel-Tabelle (Microsoft®)). Bezüglich der jeweiligen HPZ-Proben, die mit den je nach Versuchsanordnung geplanten Endkonzentrationen der Wirkstoffe inkubiert wurden, erfolgten mindestens 3 Experimente (im Optimalfall maximal 4), um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Als Negativkontrolle dienten Proben ohne Zugabe von Substanzen.

Im Rahmen der Zellherstellung/-vorbereitung für Versuche an Tumorzelllinien wurde jeweils ein Volumenteil (20 µl) der benötigten Zellsuspension nach 24 Std. oder 48 Std. Inkubation mit den bis zur geplanten Endkonzentration verdünnten Wirkstoffen aus den Wellplatten abpipettiert und mithilfe der Trypanblaumessung die Zellvitalität ausgewertet sowie die Zellzahl kontrolliert. Die Zellsuspension wurde je nach geplanter Versuchsanordnung auch im Zusammenhang mit den anderen in dieser Arbeit eingesetzten Methoden (Durchflusszytometrie, ACAS und Immunhistochemie) verwendet. Zusätzlich zu den Proben der Zelllinien, die mit den je nach Versuchsanordnung geplanten Endkonzentrationen der Wirkstoffe inkubiert wurden, erfolgten je untersuchter Zelllinie mindestens 3 Experimente (im Optimalfall maximal 4), um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Als Negativkontrolle dienten Proben der Zelllinien, denen keine Substanzen hinzugegeben wurden. Die Untersuchungen erfolgten mit den Wirkstoffen Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid als Einzelsubstanzen gegenüber den Zelllinien KMH-2, DOHH-2, HL-60, K562 und RPMI-8226 bzw. U266. Bei der Auswertung (in Excel-Tabelle (Microsoft®) erfasst) wurde der Mittelwert der vitalen Zellen berechnet und als IC₅₀-Wert zusammengefasst. Des Weiteren erfolgten Versuchsreihen mit der Wirkstoffkombination Perifosin und Bortezomib bei KMH-2 und HL-60 Zellen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen wurden mit der CalcuSyn-Software analysiert.

3.11 Durchflusszytometrie

3.11.1 Grundlagen

Mit der Durchflusszytometrie/Fluorescence-Activated-Cell-Sorter (FACS) lassen sich Zellen analysieren. Grundlage hierfür sind Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der Einzelzellen. Mittels spezifischer Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe können die Zellen charakterisiert werden und somit Aussagen über Lymphozyteneigenschaften, den Zellzyklus, Absolutzellzahlen und die Funktion getroffen werden. Mit einem Laser werden die durch verschiedene Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe markierten Zellen erfasst. Aufgrund der Streulichteigenschaften der Einzelzelle werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt, die wiederum selbst ein spezifisches

Signal (=Fluoreszenz als angeregtes Licht) aussenden. Das Durchflusszytometer kann zeitgleich Fluoreszenz- und Streulichtsignale von Einzelzellen messen. Somit werden innerhalb von kürzester Zeit zehntausende Zellen analysiert und es kann eine Aussage über deren Größe und Granularität getroffen werden. Wichtige Bedingung für die Messung am Durchflusszytometer ist eine monodisperse Zellsuspension in einer Konzentration von etwa 10^6 Zellen/ml. Vor der Messung werden die Zellen mit Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen markiert, danach als Zellsuspension über eine Messküvette der Messkammer zugeführt und aufgetrennt. Hier erfolgt durch den Laser (Lichtstrahl, optisches System) in Sekunden die Zellanalyse. Weiterhin wird die danach von der Einzelzelle ausgehende Lichtstreuung gemessen und zwischen der Vorwärtsstreuung FSC (forward light scatter) als Maß für die Zellgröße und der Seitwärtsstreuung SSC (side scatter) als Maß für die Granularität unterschieden. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt, indem der Fluoreszenzfarbstoff durch den Laser (= bestimmter Lichtbereich) angeregt wird und daraufhin ein spezifisches Emissionsspektrum ausgibt (=Anregungslicht), welches von verschiedenen Detektoren gemessen wird. Die in der Durchflusszytometrie für die Immunfluoreszenzbestimmung am häufigsten eingesetzten Farbstoffe sind Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE), Thiazolorange (TO) für die Retikulozytenmessung, Propidiumiodid (PI) für die DNA-Analyse und weitere fluoreszierende Substanzen wie Fluoresceindiacetat für die Beurteilung von Enzymaktivitäten. Die Kombination mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe, wie sie auch hier in den Versuchen eingesetzt wurde, ermöglichte die Untersuchung verschiedener Zelleigenschaften (u.a. Analyse der Proliferation, Apoptose, der Zellaktivierung und Antigenexpression). Die gängigsten Kombinationen der Mehrfarbenfluoreszenzanalyse sind FITC/PE (Zweifarbennimmunfluoreszenz), FITC/PI (DNA-Analyse), FITC/PE/7-AAD (Zellzyklusanalyse) und FITC/PE/PI (Messung avitaler Zellen). Moderne Durchflusszytometer teilen jede messbare Zelleigenschaft in bestimmte Kanäle ein, so dass es dem Untersuchenden möglich ist, durch eine Filtersetzung (Gating) oder Signalverstärkung/-verminderung gewünschte/verschiedene Zelleigenschaften/-arten (Parameterkombinationen) messen bzw. analysieren zu können. Ein Durchflusszytometer kann gleichzeitig mehrere Parameter messen (Lichtstreuungen und Fluoreszenzen). In Abhängigkeit von der Softwareausstattung des Durchflusszytometers können die Ergebnisse auf unterschiedliche Weise dargestellt werden. Die einfachste Darstellungsform ist der Histogramm-Plot, welcher die Häufigkeitsverteilung eines Parameters (Zelleigenschaft) in Relation zur Fluoreszenzintensität abbildet. Wenn mit dem Histogramm-Plot keine Aussage darüber gemacht werden kann, welche Zelle bei der Zellgrößenverteilung welcher Zelle der Fluoreszenzverteilung entspricht, so wird die Dot-Plot Darstellung (Zweiparameterdarstellung) herangezogen. Hierbei

werden zwei Parameter (z.B. Vorwärtsstreulicht und Fluoreszenz) miteinander kombiniert und mithilfe ihrer Darstellung Rückschlüsse auf die Zellgröße und auf die assoziierte Fluoreszenz gezogen. Analog dazu können auch zwei Fluoreszenzen oder eine Fluoreszenz und ein Sidescatter kombiniert werden. Da die Ergebnisse bei der Dot-Plot-Darstellung zweidimensional als Punkte und somit Zellen mit gleichen Eigenschaften als ein Punkt erscheinen, kann durch diese Darstellung nicht die wahre Zellzahl wiedergegeben werden. Mithilfe des Dichteplots erfolgt eine farbliche Unterscheidung übereinanderliegender Punkte des Dot-Plots und somit eine detailliertere Darstellung der Ergebnisse [133-136]. In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen anhand des Dichteplots mithilfe der gerätespezifischen Software dargestellt.

3.11.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zielten bei den Versuchen mit HPZ gesunder Spender auf die Messung des Anteils apoptotischer Zellen ab. Im Rahmen dieser nicht-klonogenen Untersuchungen wurden PB HPZ mit bzw. ohne CD34⁺-Zellselektion in einer Zellkonzentration von 5×10^5 /ml oder 1×10^6 /ml (in Abhängigkeit von der vorhandenen Ausbeute an Stammzellen) in RPMI-1640 Medium mit Supplementierung von 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) und 1% Glutamin (Gibco, Biochrom AG) eingestellt und in Röhrchen vorgehalten. Für die Durchflusszytometrie-Analysen wurde die Zellsuspension in Wellplatten (NuncTM Zellkultur-Multischalen) aliquotiert. Pro Ansatz wurden in Abhängigkeit von der Versuchsanzahl je Schale/Vial 1 ml pipettiert ggf. auch 2 ml, falls Proben für mehrere Untersuchungen wie z.B. Trypanblauvitalitätsmessung oder Immunhistochemie nötig waren. In diesem Fall wurde analog die Menge der Zusätze, z.B. Substanzen, ebenfalls verdoppelt. Die Wirkstoffe Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid wurden je nach Versuchsplanung in der jeweiligen Konzentration zur Zell-Medium-Suspension pipettiert. Als Negativkontrolle diente dabei eine Zell-Medium-Suspension, die keine Wirkstoffe enthielt, und als Positivkontrolle die Zellprobe einer ausgewählten Tumorzelllinie mit Wirkstoff-Zugabe. Die NuncTM-Wellplatten wurden nummeriert und beschriftet, um eine Zuordnung der jeweiligen Proben während der Durchflusszytometrie-Messung sicherzustellen. Danach wurde die Zell-Wirkstoff-Suspension je nach Versuchsplanung für 24 Std. und/oder 48 Std. inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben vor der Durchflusszytometrie-Messung mit dem entsprechenden Apoptose-Assay (- CaspACETM FITC-VAD-FMK *in situ* Marker (Promega, Mannheim) und Annexin-V-FITC Kit (Beckman Coulter) weiter verarbeitet.

Da bei der Zellapoptose Caspasen aktiviert werden, ließ sich mithilfe des CaspACE™ FITC-VAD-FMK *in situ* Markers, der aktivierte Caspasen bindet, bei den zu untersuchenden Zellen die aktivierte Caspase-3 (Schlüsselenzym der Apoptose) nachweisen. Die Zellsuspension wurde in Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt und jeweils beschriftet. Dabei wurden ein Durchflusszytometrie-Röhrchen mit der Bezeichnung „negativ“ und weitere Röhrchen mit der Bezeichnung „Caspase“ (Anzahl der Röhrchen abhängig davon, wie viele verschiedene Zell-Wirkstoff-Proben inkubiert worden waren, z.B. jeweilige Konzentrationsreihen wie Perifosin 10 µM, Bortezomib 10 nM usw.) beschriftet. Weitere Röhrchen wurden als „PI“ (Inkubation mit Propiumiodid, Sigma, Taufkirchen), ein Röhrchen mit „CD34⁺-Antikörper“ (Zellen der Negativkontrolle) markiert. Nach Zentrifugation (Megafuge 1.0R Thermo Fisher Scientific, Heraeus, 1700 U/min, 5 Min.) wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet in 200 µl RPMI-1640 Medium (Gibco, Biochrom AG) resuspendiert. Anschließend wurden in die jeweils entsprechend beschrifteten Röhrchen 2 µL Caspasereagenz von Promega (nach 1:5 Verdünnung mit PBS, Biochrom AG) pipettiert, 20 Min. lang im Brutschrank inkubiert und danach zweimal mit PBS (Biochrom AG) und 2% FKS gewaschen (dazwischen wie beschrieben Zentrifugation). Im weiteren Schritt wurden in jedes Durchflusszytometrie-Röhrchen zu der gewaschenen Zell-Caspase-Suspension 20 µl des CD34⁺-PE-Antikörpers (zur Identifizierung der CD34⁺-Zellen) hinzugegeben und im Kühlschrank 20 Min. lang inkubiert. Danach erfolgte ein abschließender zweimaliger Waschgang mit PBS (Biochrom AG) (ohne FKS und dazwischen wie oben Zentrifugation). Direkt vor der Multiparameter-Durchflusszytometrie-Messung wurden 100 µL PI (nach 1:500 Verdünnung mit PBS, Biochrom AG) in das je zu untersuchende, mit „PI“ (Sigma) beschriftete Durchflusszytometrie-Röhrchen zugegeben.

Mit dem Annexin-Assay (AMS Biotechnology Limited, Abingdon, UK) lassen sich nekrotische und apoptotische Zellen sowie noch lebende, aber in Frühapoptose befindliche Zellen genau unterscheiden. Grundlage des Annexin-V-Assays ist, dass sich Annexin-V mit PI an Phosphatidylserin, einen Bestandteil der Zellmembranen, bindet.

Bei den Annexin-V-FITC/PI-Assays wurde nach Herstellerempfehlung die Zellsuspension in kaltem PBS (Biochrom AG) gewaschen, zentrifugiert und die Zellen mit PBS (Biochrom AG) auf 5×10^5 - 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Danach erfolgte die Zugabe von 15 µl Annexin-V-FITC und 5 µl gelöstem PI zu 490 µl Zellsuspension. Nach 5-10 Min. Inkubation bei Zimmertemperatur im Dunkeln konnte die durchflusszytometrische Analyse (AMS Biotechnology Limited) durchgeführt werden. Die zu untersuchenden Proben wurden mit einem standardmäßigen Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson Biosciences, San José,

CA, USA) unter Verwendung der CELLQuest- (Becton Dickinson, Heidelberg) oder FlowJo-Software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA) analysiert.

Für die Datenauswertung wurden Caspase-FITC⁻/PI⁻ und Annexin-V-FITC⁻/PI⁻ Zellen als lebend definiert, Caspase-FITC⁺/PI⁻ und Annexin-V-FITC⁺/PI⁻ Zellen als frühapoptotisch, Caspase-FITC⁺/PI⁺ und Annexin-V-FITC⁺/PI⁺ Zellen als spätapoptotisch und Caspase-FITC⁻/PI⁺ und Annexin-V-FITC⁻/PI⁺ Zellen als nekrotisch eingestuft.

Im Rahmen der Untersuchungen an malignen Zelllinien wurde der Anteil apoptotischer Zellen auf Grundlage der eingesetzten Caspase- (CaspACE FITC-VAD-FMK, Promega, Mannheim) und Annexin-V-Assays (AMS Biotechnology Limited) gemessen. Zunächst wurde die Zellzahl der jeweils inkubierten Zelllinien per Hämocytometer bestimmt. Entsprechend der Zellkonzentration einem Wert von $5 \times 10^5/\text{ml}$ oder $1 \times 10^6/\text{ml}$, so konnten die Zellen für die Durchflusszytometrie-Messung vorbereitet werden. Für die Durchflusszytometrie-Analysen wurde die Zellsuspension analog zu den Analysen bei den Versuchen mit HPZ gesunder Spender, wie unter Kapitel 3.11.2 Absatz 1 beschrieben, weiterverarbeitet. Nach der Inkubation wurden die in Wellplatten (Nunc™ Zellkultur-Multischalen) aliquotierten Proben der jeweils ausgewählten Zellkulturen mit einem Volumen von 200 µl für die Durchflusszytometrie-Messung abpipettiert und mit den entsprechenden Apoptose-Assays wie oben beschrieben vorbereitet. Die Zellen wurden bei 37°C nach 20 Min. Inkubationszeit mit dem Caspase *in situ* Marker (CaspACE FITC-VAD-FMK, Promega, Mannheim) in 200 µl Medium (RPMI-1640 Medium, 10% FKS, 2% Penicillin/Streptomycin und 2% Glutamin, Gibco) resuspendiert. Propidiumiodid (PI, Sigma) wurde nach zwei Waschschritten hinzugefügt und die Proben mit dem Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA) untersucht. Für die Annexin-V-Assays (AMS Biotechnology Limited) wurden die Zellen in kalter PBS (Biochrom AG) resuspendiert, nach 15 Min. Inkubation mit PI und Annexin-V-FITC bei Raumtemperatur suspendiert und durchflusszytometrisch untersucht.

Die Untersuchungen erfolgten mit Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid als Einzelwirkstoffen gegenüber den Zelllinien KMH-2, DOHH-2, HL-60, K562 und RPMI-8226 bzw. U266. Des Weiteren wurden Versuchsreihen mit der Wirkstoffkombination Perifosin und Bortezomib bei HL-60 Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen wurden mit der CalcuSyn-Software analysiert. Die ermittelten Daten des Durchflusszytometrie-Verfahrens wurden anhand des Dichteplot mithilfe der gerätespezifischen Software von CELLQuest- (Becton Dickinson, Heidelberg) oder der FlowJo-Software (Tree Star, Inc.) analog zu den Daten der Versuche an den HPZ gesunder Spender wie oben beschrieben unter Berücksichtigung der Einstufung nach lebend, frühapoptotisch, spätapoptotisch und nekrotisch ausgewertet.

3.12 Immunhistochemische Untersuchungen

CD34⁺-selektierte HPZ, die im Rahmen von nicht-klonogenen Untersuchungen (Flüssigkulturen mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.11) sowie Trypanblaumessungen (siehe 3.10)) evaluiert wurden, waren ebenfalls Bezugsquelle für immunhistochemische Versuche unter Einsatz des zytologischen Cytospinverfahrens. Es ermöglicht eine Konzentration und Auswertung der in geringer Anzahl vorkommenden Zellen. Dabei ist es von Vorteil, dass Präparate mit gleichmäßiger Zellverteilung entstehen.

Voraussetzung für die immunhistochemische Färbetechnik ist ihre Eigenschaft, mithilfe von Antigen-Antikörper-Bindungen spezifische Proteine zu identifizieren bzw. Zellstrukturen zu erkennen. In den Versuchen kamen Caspase-3- und Ki-67-Antikörper zum Einsatz. Das Ki-67-Antigen ist ein Proliferationsmarker, sodass eine Ki-67-Färbung Informationen über das Tumorstadium liefern kann. Da das Vorkommen aktivierter Caspase-3 als spezifisch für apoptotische Zellen anzusehen ist, gilt der Caspase-3-Antikörper als Apoptosemarker. Vor Herstellung der Cytospins wurden die für die Durchflusszytometrie- sowie Trypanblaumessungen gewonnenen CD34⁺-selektierten HPZ in einer Zellkonzentration von 5×10^5 /ml oder 1×10^6 /ml in RPMI-1640 Medium mit Supplementierung von 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) und 1% Glutamin (Gibco, Biochrom AG) eingestellt und in Wellplatten (Nunc™ Zellkultur-Multischalen) aliquotiert. Pro Ansatz wurden in Abhängigkeit von der Versuchsanzahl je Schale/Vial 1 ml - 2 ml pipettiert. Die antineoplastischen Substanzen Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid wurden je nach Versuchsplanung in der jeweiligen Konzentration zur Zell-Medium-Suspension pipettiert. Nach 24 Std. Inkubation wurden 200 µl der gewünschten Zellsuspension mit einer Mindestzellzahl von 1×10^6 Zellen/Slide zur Herstellung der Cytospins abpipettiert und in PBS (Biochrom AG) gewaschen. Zellzahlbestimmungen und Vitalitätsmessungen erfolgten mittels Hämocytometer (siehe 3.10). Zur Herstellung von mehreren benötigten Cytospinpräparaten musste die 200 µl Zellsuspension nach Berechnung entsprechend in PBS (Biochrom AG) aufgeteilt werden, damit 1×10^5 Zellen je Präparat gewährleistet waren. Die Objektträger (Thermo Scientific™ Shandon™) wurden beschriftet und anschließend an ihrer glatten Seite in die Metallklemme mit Filter (Thermo Scientific™ Shandon™) eingelegt. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension in den Trichter gefüllt und 3 Min. bei 1.000 rpm zentrifugiert (Cytozentrifuge Thermo Scientific™ Shandon™). Nach der Zentrifugation wurden die Cytospinpräparate aus der Metallklemme gelöst und in einer Sammelmappe über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Proben 5 Min. lang in 100% Ethanol fixiert und erneut getrocknet. Im zweiten Schritt erfolgte die immunhistochemische Färbung. Die

Cytospins wurden 1 Std. lang in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert, danach mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%) entwässert und 1 Std. im Brutschrank bei ~55°C getrocknet. Im Folgenden wurden die Spins 2 Min. lang mit Citratpuffer gekocht (Demaskierung), 10 Min. lang in 3% H₂O₂ geblockt, mit Aqua Dest. (destilliertes Wasser) gespült und in „Tris-buffered saline“ (TBS-Puffer) (TBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gestellt. Danach wurden die Spins 30 Min. lang mit Caspase-3-Antikörpern (Asp175, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) im Verhältnis von 1:200 verdünnt und mit Antibody-Diluent (S2022, Dako-Kit) inkubiert. In den weiteren Schritten wurden die Cytospins mit TBS-Puffer gespült, 1 Std. lang mit Envision PO anti rabbit (K4003, Dako-Kit) inkubiert und erneut mit TBS-Puffer gespült. Danach erfolgte eine 10 Min. Einwirkung von Peroxidase-Entwickler (K5001, Dako-Kit), die Spülung mit Aqua Dest. (destilliertes Wasser), ein nochmaliges Kochen der Spins mit Citratpuffer (2 Min.), eine 30 Min. Inkubation mit dem Ki-67-Antikörper (MIB-1, Dako, Glostrup, Dänemark) sowie anschließend eine 1:1.000 Verdünnung mit Antibody-Diluent (S2022, Dako-Kit). In den letzten Schritten erfolgte die Behandlung mit dem Biotin-Streptavidin-Alkali-Phosphatase-Kit (Bottle A und Bottle B und ~ 3 Min. ABC-Entwickler, K5005, Dako-Kit) unter zweimaligem Spülen mit TBS-Puffer, Gegenfärbung mit Hämalaun (1 Min.), Blaufärbung in kaltem Wasser sowie Eindeckeln (Deckgläser) mit Glycingelantine. Für die Auswertung der Cytospins wurde die Alkali-Phosphatase von Fast Red als chromogen ausgewiesen. Für Negativkontrollen wurden Isotypen der primären Antikörper eingesetzt. Tonsillengewebe mit follikulärer Hyperplasie diente als Positivkontrolle (mit stark positiven Ki-67-Keimzentren und zahlreichen Caspase-3-positiven apoptotischen Zellen).

Die Cytospinpräparate wurden mit einem Durchlichtmikroskop (40x-100x high power field) hinsichtlich angefarbter Zellen untersucht (siehe Beispiele für hergestellte Cytospinpräparate in den Abbildungen 12-13). Ki-67-positive Zellen (= Zellproliferation) wurden anhand einer Rotfärbung im Zellkern oder in den Kernteilen identifiziert (keine Rotfärbung = Zellzyklusruhephase). Caspase-3-positive Zellen zeigten ebenfalls eine Rotfärbung (=Zellen in Apoptose). Die Präparate wurden im 4-Augen-Prinzip (Doktorand und Mitarbeiter der Pathologie) in standardisierter Weise mikroskopiert und beurteilt. Innerhalb der Präparate wurden zwei verschiedene repräsentative Felder pro Schnitt ausgewählt und in jedem Feld in etwa 100 Tumorzellen gezählt. Der Anteil der Ki-67- und Caspase-3-positiven Zellen an der Gesamtumorzellzahl wurde dann in Prozent als Ki-67- oder Caspase-3-Index angegeben [137-141] und in einer Excel-Tabelle (Microsoft®) erfasst.

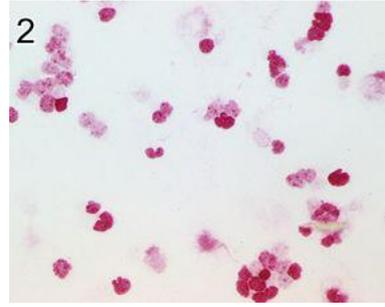
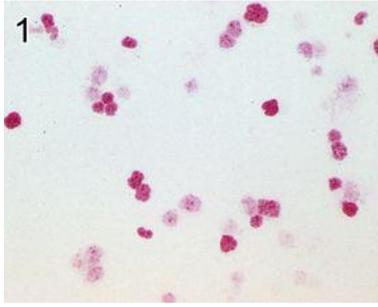


Abbildung 12: Beispiel für Cytospinpräparate (bei 100facher Vergrößerung) von CD34⁺-Ki-67-positiven Zellen mit Perifosin 20 µM (Photo 1) und CD34⁺-Ki-67-positiven Zellen ohne Wirkstoff (Photo 2)

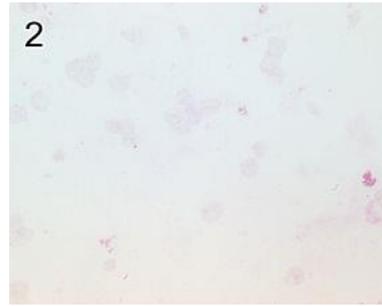
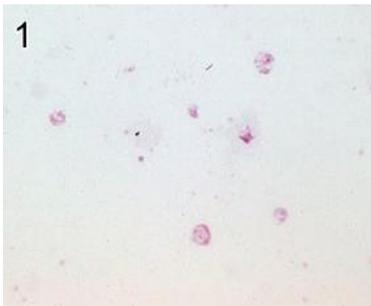


Abbildung 13: Beispiel für Cytospinpräparate (bei 100facher Vergrößerung) von CD34⁺-Caspase-3-positiven Zellen mit Perifosin 20 µM (Photo 1) und CD34⁺-Caspase-3-positiven Zellen ohne Wirkstoff (Photo 2)

Bei den Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien wurden vor Herstellung der Cytospins zunächst die Zellzahl und die Vitalität der jeweils inkubierten (nach 24 Std. Inkubation mit den in der jeweils geplanten Endkonzentration verdünnten Substanzen) Zelllinien per Hämocytometer (siehe 3.10) gemessen. Entsprechend der Zellkonzentration einem Wert von $1 \times 10^6/\text{ml}$, so konnten die Zellen vorbereitet werden. Dafür wurden die in Wellplatten (Nunc™ Zellkultur-Multischalen) aliquotierten Proben (Pro Ansatz wurden in Abhängigkeit von der Versuchsanzahl je Schale/Vial 1 ml - 2 ml pipettiert) der ausgewählten Zellkulturen jeweils mit einem Volumen von 200 µl für die Cytospins abpipettiert und in PBS (Biochrom AG) gewaschen. Die weiteren Schritte der Cytospinherstellung sowie auch immunhistochemischen Färbung und die Datenauswertung erfolgten analog der Beschreibungen zu den Untersuchungen an hämatopoetischen Progenitorzellen gesunder Spender. Für Negativkontrollen wurden Isotypen der primären Antikörper eingesetzt. Tonsillengewebe mit folliculärer Hyperplasie diente als Positivkontrolle (mit stark positiven Ki-67-Keimzentren und zahlreichen Caspase-3-positiven apoptotischen Zellen). Die Cytospinpräparate wurden mit einem Durchlichtmikroskop (40x-100x high power field) hinsichtlich angefarbter Zellen untersucht (siehe Beispiele für hergestellte Cytospinpräparate in Abbildung 14). Ki-67-positive Zellen (= Zellproliferation) wurden anhand einer Rotfärbung im Zellkern oder in Kernteilen identifiziert (keine Rotfärbung = Zellzyklusruhephase). Caspase-3-positive Zellen zeigten ebenfalls eine Rotfärbung (=Zellen in

Apoptose). Die Präparate wurden im 4-Augen-Prinzip (Doktorand und Mitarbeiter der Pathologie) auf standardisierte Weise mikroskopiert und beurteilt. Innerhalb der Präparate wurden zwei verschiedene repräsentative Felder pro Schnitt ausgewählt. In jedem Feld wurden etwa 100 Tumorzellen ausgezählt. Der Anteil der Ki-67- und Caspase-3 positiven Zellen an der Gesamtumorzellzahl wurde dann in Prozent als Ki-67- oder Caspase-3-Index angegeben [137-141] und in einer Excel-Tabelle (Microsoft®) erfasst. Die immunhistochemischen Versuche erfolgten mit den Substanzen Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid und den Zelllinien HL-60, K562 und U266.

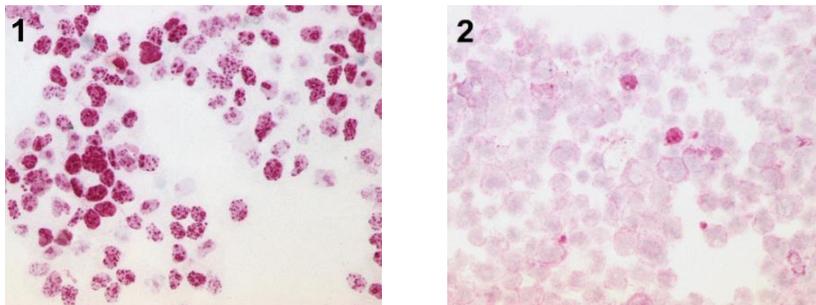


Abbildung 14: Beispiel für Cytospinpräparate (bei 100facher Vergrößerung) von Zelllinie U266 mit Ki-67-positiven Zellen mit Perifosin 20 μ M (Photo 1) und von Zelllinie K562 mit Caspase-3-positiven Zellen mit Perifosin 10 μ M (Photo 2)

3.13 Messungen mit dem Hämatologie-Analysegerät XE-5000 (ACAS)

3.13.1 Grundlagen

Neben der Durchflusszytometrie, die gängiger Standard bei der Untersuchung und Trennung von Zellsuspensionen bzw. Zellpopulationen ist, gibt es in der Hämatologie spezielle Fluoreszenz-Durchflusszytometrie-Verfahren wie den XE-5000 Case Manager (ACAS-Verfahren) der Firma Sysmex. Diese Geräte haben in der Diagnostik von Apoptoseprozessen bisher noch keine breit gefächerte Anwendung gefunden. Das vollautomatische Analysegerät XE-5000 (Sysmex Europe, Norderstedt) ermöglicht die Messung und Auswertung von 79 Parametern. Dabei werden die technischen Eigenschaften einer gängigen Fluoreszenz-Durchflusszytometrie mit einer Mehrkanalmesstechnologie, neuen spezifischen Parametern, bestimmten Reagenzien und einer neuen integrierten Diagnostikeinheit (Case Manager) kombiniert. Somit vereint der XE-5000 mehrere verschiedene Technologien und Reagenzien in einem Gerät. Die zu untersuchenden Proben müssen nicht speziell aufwändig mittels bestimmter Assays vorbereitet werden, sondern werden „on the fly“ direkt im Gerät mit den jeweiligen Reagenzien inkubiert. Mit dem XE-5000 Case Manager werden Histogramme und Scattergramme erstellt, die Informationen über die Zellmorphologie, -anomalien und -verteilungen liefern können. Zudem

besitzt der Case Manager des XE-5000 die Fähigkeit, die untersuchten Proben selbständig auszuwerten und dem Untersucher somit erste Hinweise zu geben. Bevor der für die Probenuntersuchung benutzte IMI-Kanal (Radio Frequency (RF) / Direct Current (DC)-Methode) erläutert wird, erfolgt eine kurze Beschreibung der wichtigsten Messparameter des XE-5000 Case Managers. Im RBC/PLT- Kanal erfolgt mittels einer kumulativen Impulshöhensummierung eine Analyse (Zellgröße, -verteilung, Hämatokrit- und Hämoglobinbestimmung) von Erythrozyten und Thrombozyten mit der Cellpack- und Cellsheath-Reagenz. Im Hämoglobinkanal (Sodium-Lauryl-Sulfat-Hämoglobin-Methode) führt das Reagenz Sulfolyser zur Freisetzung von Hämoglobin aus den Erythrozyten (Hämoglobinmessung). Der Durchflusszytometriekanal WBC/BASO (Reagenz Stromatolyser-FB) analysiert Leukozyten und basophile Granulozyten nach Zellgröße und Morphologie (Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht). Im DIFF-Kanal (Fluoreszenz-Durchflusszytometrie) werden die Reagenzien Stromatolyser-4DL (zur Zelllyse) und Stromatolyser-4DS (Fluoreszenzfarbstoff) eingesetzt und somit die Fluoreszenzintensität (RNA/DNA-Gehalt der Zelle, Zellaktivität, -reife) sowie Seitwärtsstreulichtintensität (Granularität, Kerngröße, Zellstruktur) gemessen. Dadurch können die Leukozyten in Subpopulationen (Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile und Eosinophile) differenziert und explizit dargestellt werden. Mit den Reagenzien Stromatolyser-NR Diluent und Dye können im NRBC-Kanal kernhaltige erythrozytäre Vorstufen gezählt werden (durchflusszytometrische Analyse von Vorwärtsstreulicht und Fluoreszenzintensität). Der RET-Kanal bestimmt mittels der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Reagenz Ret-Search (II) Lysereagenz und Fluoreszenzfarbstoff) die Retikulozyten und deren Altersstufen (Analyse des Vorwärtsstreulichts und der Fluoreszenzintensität). Der Body-Fluid-Modus (DIFF- und RBC/PLT-Kanal) ist eine neue Methode zur direkten Messung von Körperflüssigkeiten (Liquor, Aszites-, Pleurapunktate), ohne dass Proben speziell vorbereitet werden müssen. Somit lassen sich in kürzester Zeit Leukozyten und Erythrozyten differenzieren [142-146]. Mit dem IMI-Kanal lassen sich unreife Vorstufen der Granulozyten bestimmen. Die zu untersuchenden Zellen werden nach Aufnahme in das Gerät zuerst mit Stromatolyser-IM-Reagenz inkubiert. Dieser Reagenzstoff enthält einen polyoxyethylenen nichtionischen Surfactant und eine schwefelhaltige Aminosäure, um zytoplasmatische Komponenten und Membranen zu fixieren. Nach Aufnahme der zu untersuchenden Zellsuspension in das Gerät wird die Probe automatisch in einem Verhältnis von 1:250 mit dem Reagenzstoff verdünnt, 13 Sekunden lang bei 33°C inkubiert und ausgemessen. Während bzw. nach der Inkubation beschädigt der nichtionische Surfactant die Blutzellmembranen in Abhängigkeit vom Grad der Lipidzusammensetzung des jeweilig untersuchten Zelltyps [144, 146-149]. Beispielsweise werden alle reifen Leukozyten aufgrund

ihres Lipidanteils durch das Reagenz lysiert. Lipide umfassen sowohl bei polymorphkernigen Leukozyten als auch bei Lymphozyten in etwa 5% des nassen Zellgewichts. Bei regulären polymorphkernigen Leukozyten und Lymphozyten sind in etwa 35% aller Lipide Phospholipide, der Cholesterin-Anteil liegt bei etwa 10% [144, 150]. Unreife Leukozyten enthalten weniger Cholesterin und Sphingomyelin, aber mehr Phosphatidylcholin als reife Zellen, sodass unreife Zellen (Zellmembranen) aufgrund ihres höheren Aminosäuregehaltes nur teilweise lysiert werden [144, 151]. Das Polyoxyethylen-Niotensid und die schwefelhaltige Aminosäure gelangen durch die durchlässig gewordenen Membranen in die Zellen, binden an das Zytoplasma und verhindern dadurch seine Auflösung. Infolgedessen verbinden sich unreife Leukozyten mit ihren Membranen und das Zytoplasma bleibt erhalten. Nachdem die Zellmembranen der reifen Leukozyten lysiert wurden, schrumpfen die reifen Leukozyten und ihr Zytoplasma löst sich auf, bis die Zellkerne bloß liegen. Im zweiten Schritt der Untersuchung im IMI-Kanal werden die Zellen von der Mischkammer in den Messwandler, in dem die Zellzählung stattfindet, überführt. Die RF/DC-Methode erkennt Widerstandsveränderungen als Signale, wenn die Zellen den Sensor passieren. Analysen dieser Parameter liefern detaillierte morphologische Informationen über jede einzelne Zelle bezüglich ihrer Größe (Volumen DC), ihrer inneren Zusammensetzung und ihrer Komplexität (Kern/Plasma-Verhältnis RF). Durch die Signaldifferenzierung werden die Zellen in stabkernige Granulozyten, unreife Granulozyten (Promyelozyten, Myelozyten, Metamyelozyten) und Blasten aufgetrennt. Reife Leukozyten und Zellen im IMI-Kanal werden im Scattergramm separat ausgewertet und getrennt dargestellt. Somit eröffnet sich mit der IMI-Kanal-Methode eine besondere Möglichkeit, Zellproben ohne spezielle Vorbereitung zügig zu untersuchen [143, 144, 148, 152].

3.13.2 Untersuchungen mit dem Hämatologie-Analysegerät XE-5000

Unter grundlegender Beeinflussung der Zellmembranen durch das Stromatolyser-IM-Reagenz werden im IMI-Kanal in erster Linie reife und unreife Leukozyten untersucht und unreife Vorstufen der Granulozyten bestimmt. Der Aspekt, dass die in dieser Arbeit eingesetzten antineoplastischen Substanzen ebenfalls an der Zellmembran agieren, ließ die Arbeitshypothese/Frage entstehen, ob durch die IMI-Technik zytotoxische Prozesse (Anteil apoptotischer Zellen) der Wirkstoffe im Rahmen der Untersuchungen an malignen Zelllinien ermittelt werden und mit dem Gerät Effekte messbar sein könnten. Zuerst wurden Zellzahl und Vitalität der jeweils inkubierten (entweder nach nur 24 Std. und/oder 48 Std. Inkubation mit den in der jeweils geplanten Endkonzentration verdünnten Wirkstoffen) Zelllinien per Häemocytometer (siehe 3.10) gemessen. Entsprechend der Zellkonzentration einem Wert von $5 \times$

$10^5/\text{ml}$ oder $1 \times 10^6/\text{ml}$, so konnten die Zellen für die Messung vorbereitet werden. Hierzu wurde 1 ml der in den Wellplatten (Nunc™ Zellkultur-Multischalen) aliquotierten Proben (Pro Ansatz wurden in Abhängigkeit von der Versuchszahl je Schale/Vial 1 ml - 2 ml pipettiert.) der jeweils ausgewählten Zellkulturen zuerst zentrifugiert, in PBS (Biochrom AG) wieder suspendiert (gut durchmischt), mit je einem Volumen von 200 μl in Durchflusszytometrie-Röhrchen (BD Falcon) überführt und beschriftet. Zu den jeweiligen Proben der Zelllinien, die mit den je nach Versuchsanordnung geplanten Endkonzentrationen der Substanzen inkubiert wurden, erfolgten mindestens 3 Serien (Triplicates, im Optimalfall auch mehr) je untersuchter Zelllinie, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Als Negativkontrolle dienten Proben der Zelllinien, denen keine Substanzen hinzugegeben wurden.

Am XE-5000 wurde die jeweilige Probennummer registriert, der Analysemodus eingestellt und das Röhrchen in den Rack gestellt, damit die Zellsuspension in die Mischkammer hineingesogen werden konnte. Die Ergebnisse der Messungen wurden automatisch vom Analysegerät mit dem Streudiagramm (Scattergramm) ausgegeben. Zusätzlich wurden die vom Gerät ausgegebenen Messwerte Gesamtzellzahl ($\times 1000/\mu\text{l}$, = "WBC"), IMI # (Gesamt), „immature myeloid information direct current“ (IMIDC), „immature myeloid information radio frequency“ (IMIRF) und DIFFX / DIFFY (Sensitivitätsparameter) aller Proben für die statistische Auswertung per Excel-Tabelle (Microsoft®) erfasst. Die Untersuchungen erfolgten mit den Substanzen Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid und den Zelllinien KMH-2, DOHH-2, HL-60, K562 und RPMI-8226 bzw. U266.

3.14 Statistische Analysen

Alle benötigten Daten der klonogenen sowie nicht-klonogenen Versuchsansätze aus den Untersuchungen an hämatopoetischen Progenitorzellen gesunder Spender und sämtliche als relevant erachteten Daten der Untersuchungen an malignen Zelllinien wurden für die statistische Auswertung in Form von Excel-Tabellen sowie Worddateien (Microsoft®) gespeichert. Kontinuierliche Variablen bzw. Ergebnisse der laufenden Messungen wurden in verschiedenen Untersuchungsgruppen unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests bezüglich ihrer zentralen Tendenzen auf Abweichungen hin verglichen. P-Werte <0.05 (zweiseitig) wurden als statistisch signifikant angesehen. Die im Handel erhältliche PASW-Software (Version 18.0, Chicago, IL, USA) wurde für statistische Analysen genutzt. Bei den Untersuchungen an hämatopoetischen Progenitorzellen gesunder Spender wurden die inhibitorischen Konzentrationen IC_{10} , IC_{50} und IC_{90} als die Medikamentendosis definiert, welche im Vergleich zur Negativkontrolle zu einer 10%igen, 50%igen oder 90%igen Hemmung der CFUs führte. IC_{10} - und IC_{90} -Messwerte wurden

systematisch mit der Reed und Muench-Methode berechnet, während die IC₅₀-Messwerte durch nichtlineare Regression, sofern anwendbar, unter Einsatz der GraphPad Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) bestimmt wurden. In allen anderen Fällen wurde die Reed und Muench-Methode angewendet [153]. Bei den Untersuchungen an verschiedenen malignen Zelllinien wurde die mit der Reed und Muench-Methode [153] berechnete inhibitorische Konzentration IC₅₀ als Medikamentendosis definiert, die im Vergleich zur negativen Kontrolle zu einer 50%igen Hemmung führte. Um den Effekt der Wirkstoffkombination zweier Substanzen (siehe Kombination Perifosin/Lenalidomid, Perifosin/Adriamycin in Kapitel 4.1 und Perifosin/Bortezomib in Kapitel 4.2.2 und 4.3.2) mit einer Dosis-Effekt-Analyse zu beurteilen, wurde die CalcuSyn-Software (Biosoft, Great Shelford, Cambridge, UK) eingesetzt. Mit dieser Software wurden Median-Effekt-Plots, der Kombinationsindex (CI, combination index) und Isobologramm-Analysen beurteilt, um Aussagen über die Wirkungen zweier kombinierter Wirkstoffe treffen zu können. Grundlage für den Algorithmus der Software ist die Ableitung einer Median-Effekt-Gleichung des Massewirkungsgesetzes für chemische Reaktionen unter Gleichgewichtsbedingungen. Mit dem Median-Effekt-Plot werden die Dosis-Effekt-Kurven der Wirkstoffe in Geraden umgewandelt (logarithmische Berechnung). Die daraus resultierenden Geraden haben eine unterschiedliche Steigung, welche Informationen über die jeweilige Dosis-Effekt-Kurve liefert. Mit der CI- und Isobologramm-Analyse können die Effekte des Zusammenwirkens der einzelnen Substanzen und von ihrer Kombination ermittelt und somit Synergismus bzw. Antagonismus quantifiziert werden. Ein CI <1 bedeutet Synergismus, ein CI von 1 zeigt einen additiven Effekt und ein CI >1 einen Antagonismus. Die Effekt-Konzentration (EC) stellt eine bestimmte Konzentration dar, die einen definierten Effekt, z.B. eine 30%ige Toxizität, bewirkt. Diese kann dann aus dem Isobologramm abgelesen werden. Auf der y- und der x-Achse können die Äquivalenzdosen der Wirkstoffe für die EC₃₀, EC₅₀, EC₇₅ und EC₉₀ abgelesen werden. Mit dem CI kann man somit beurteilen, ob eine Wirkstoffkombination einen verstärkenden oder abschwächenden Effekt hat [154, 155]. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen an malignen Zelllinien wurden die CIs wie folgt klassifiziert: <0.90: Synergismus (Gesamtwirkung zweier Medikamente übersteigt die Summe der Einzelwirkungen), 0.90-1.10: Additiv (Gesamtwirkung zweier Medikamente entspricht der Summe der Einzelwirkungen) und >1.10: Antagonismus (Gesamtwirkung zweier Medikamente niedriger als die der jeweiligen Einzelwirkungen). Für Versuchsreihen an HPZ wurden die CIs gesondert klassifiziert: <0: Antagonismus, 0: additiv, >0 Synergismus.

4. Ergebnisse

4.1 Klonogene CFU-Assays

Mittels klonogener CFU-Assays sollte die zytotoxische Wirkung von Perifosin, Bortezomib, Lenalidomid und Adriamycin als Einzelsubstanzen sowie in ausgewählten Kombinationen gegenüber HPZ ermittelt werden. In Abbildung 15 ist die CFU-Anzahl bei bestimmten Konzentrationen von Perifosin (A und B) oder Bortezomib (C und D) im Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen, denen kein Wirkstoff hinzugegeben wurde) dargestellt (Mean + Standard deviation (SD)) und gibt die konzentrationsabhängige Hemmung der klonogenen Aktivität von HPZ wieder. In einer ersten Analyse (n=6) zeigte sich, dass Perifosin und Bortezomib konzentrationsabhängig mit einer IC₅₀ von ca. 35 µM/L bzw. 20 nM/L das Wachstum von HPZ im CFU-Assay hemmten (Abbildungen 15 A, C). Beide Substanzen inhibierten das Wachstum von CFU-GM, CFU-E, BFU-E sowie CFU-GEMM (Abbildungen 15 B, D). CFU-E waren in allen Ansätzen (einschließlich der Negativkontrolle) nur vereinzelt nachweisbar (<5/Agarplatte) und sind deshalb in den Abbildungen 15 B und D nicht separat aufgeführt.

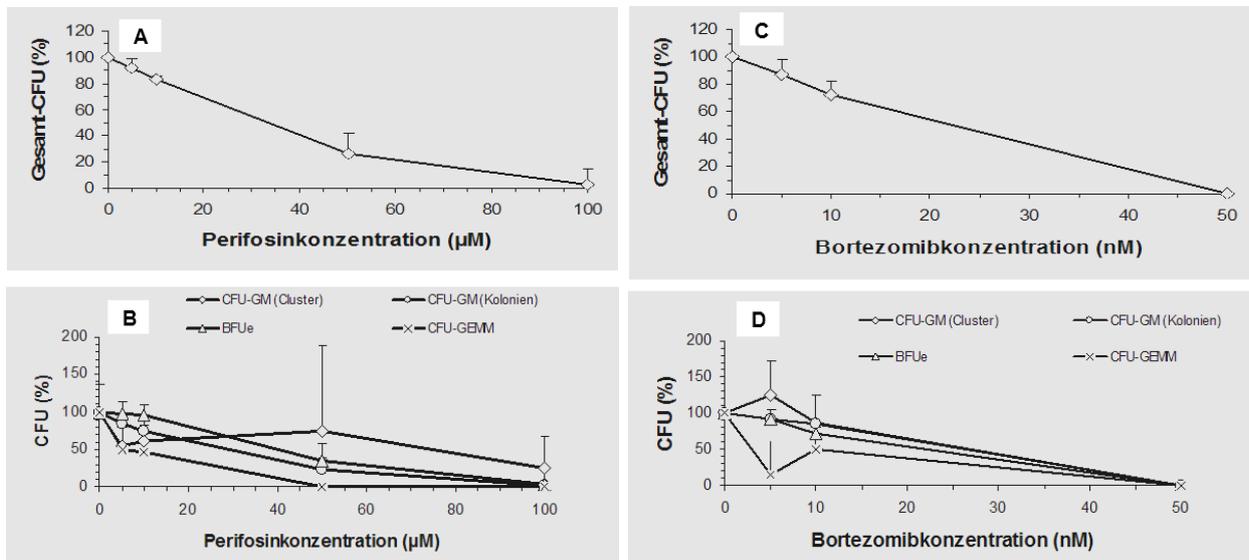


Abbildung 15: A und B CFU-Hemmung durch Perifosin, C und D CFU-Hemmung durch Bortezomib (Mean + Standard deviation, Erläuterung siehe Text). BFU-E (Burst forming unit erythroid), CFU (Colony forming unit), CFU-GM (CFU-granulocyte macrophage), CFU-GEMM (CFU-granulocyte erythroid megakaryocyte macrophage)

Tabelle 1 stellt nach Auswertung aller durchgeführten CFU-Assays die konzentrationsabhängige Hemmung (dargestellt als IC₁₀-, IC₅₀- und IC₉₀-Werte, die aus den Mittelwerten der Triplicates mit der Reed und Muench-Methode berechnet wurden) durch Perifosin und Bortezomib als Einzelsubstanzen gegenüber den unterschiedlichen CFU-Kolonien dar (ohne detaillierte

Unterscheidung zwischen CD34⁺-Progenitorzellen des KM oder des peripheren Blutes). Für die Versuche zur Untersuchung der Hemmung der CFU-Kolonien durch Bortezomib wurden PB HPZ von insgesamt 11 Spendern ohne vorherige CD34⁺-Zellselektion, von 2 Spendern mit CD34⁺-Zellselektion und von 3 KM-Spendern (Hämatopoetische Progenitorzellen des Knochenmarks (KM HPZ)) ohne CD34⁺-Zellselektion ausgewertet. Die CFU-Hemmung unterschied sich bei der Auswertung dieser Untergruppen nicht signifikant. CFU-E und CFU-GEMM-Kolonien sind in der Tabelle nicht dargestellt, da diese Kolonien aufgrund ihres geringen Vorkommens in allen Assays nicht adäquat ausgewertet werden konnten.

| Wirkstoff | CFU-Typ | IC ₁₀ | IC ₅₀ | IC ₉₀ |
|-----------------|---------|------------------|------------------|------------------|
| Perifosin [μM] | Total | 6 | 53 | >100 |
| | CFU-GM | 4 | 43 | 100 |
| | BFU-E | 8 | 60 | >100 |
| Bortezomib [nM] | Total | 4 | 14 | 32 |
| | CFU-GM | 4 | 16 | 35 |
| | BFU-E | 4 | 14 | 30 |

Tabelle 1: CFU-Hemmung an Progenitorzellen aus peripherem Blut und KM. Eigene Darstellung in Anlehnung an [156]. BFU-E (Burst forming unit erythroid), CFU (Colony forming unit), CFU-GM (CFU-granulocyte macrophage), IC (inhibitory concentration)

Abbildung 16 A-D gibt nach Auswertung aller durchgeführten CFU-Assays einen detaillierteren Überblick über die hemmende Wirkung von Perifosin auf die CFU-Kolonien der Progenitorzellen des peripheren Blutes (mit oder ohne vorheriger CD34⁺-Zellselektion) und des KM. Die blaue Linie stellt die Hemmung der CFU-Kolonien durch Perifosin bei PB HPZ (insgesamt 15 Spender) ohne vorherige CD34⁺-Zellselektion, die grüne Linie bei CD34⁺-selektierten PB HPZ (insgesamt 3 Spender) und die rote Linie bei KM-Spendern (insgesamt 3 Spender) ohne CD34⁺-Zellselektion dar. A-C zeigen Mittelwerte (+/- SD) der CFU-Kolonien bei verschiedenen Perifosin-konzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle mit den IC₅₀-Werten, die mit nicht linearer Regression berechnet wurden. Um die Wirkung der Substanzen besser darzustellen, sieht man in Abbildung 16 D das Verhältnis (Ratio) der Absolutzahlen zwischen CFU-GM und BFU-E Kolonien bei unterschiedlichen Perifosinkonzentrationen (Mittelwert und SD) der auswertbaren Experimente von insgesamt 4 Spendern, die in Triplicates angesetzt wurden. P-Werte von <0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Hemmung der Gesamt-CFUs zeigte sich beim Vergleich zwischen CD34⁺-zellselektierten und nicht CD34⁺-zellselektierten PB HPZ unter einem mit * gekennzeichneten Wert von p<0.05 als statistisch signifikant (Abbildung 16 A). Der Vergleich von CFU-GM- und BFU-E-Kolonien mit der Negativkontrolle ergab bei einer Perifosinkonzentration von 40 μM einen p-Wert von <0.10 (unter # gekennzeichnet) und bei einer Konzentration von 50 μM einen statistisch signifikanten p-Wert von <0.05 (unter ## gekennzeichnet, Abbildung 16 D).

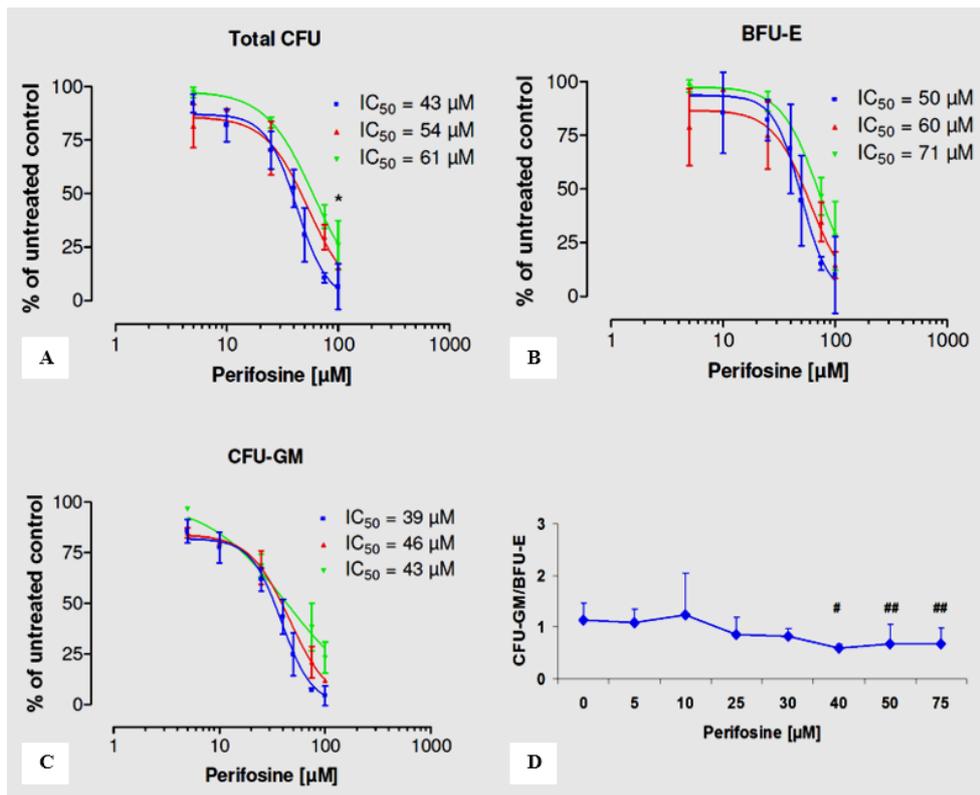


Abbildung 16 A-D: CFU-Hemmung durch Perifosin nach [156] (Erläuterung siehe Text). BFU-E (Burst forming unit erythroid), CFU (Colony forming unit), CFU-GM (CFU-granulocyte macrophage), IC (Inhibitory concentration), *p<0.05, #p<0.10, ##p<0.05

Abbildungen 17 und 18 sowie Tabelle 2 zeigen die Wirkungen von Lenalidomid und Adriamycin auf HPZ.

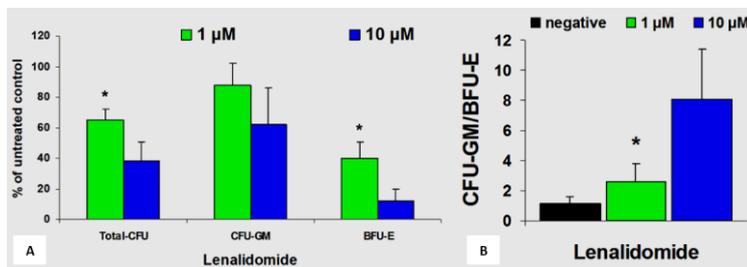


Abbildung 17: CFU-Hemmung durch Lenalidomid nach [156] (Erläuterung siehe Text). BFU-E (Burst forming unit erythroid), CFU (Colony forming unit), CFU-GM (CFU-granulocyte macrophage), *p<0.05

| Wirkstoff | CFU-Typ | IC ₅₀ |
|----------------------|---------|------------------|
| Lenalidomid (n=4) | Total | 3.6 μM |
| | CFU-GM | NR |
| | BFU-E | 0.7 μM |
| Adriamycin (n=5) | Total | 4.4 μM |
| | CFU-GM | 10.3 μM |
| | BFU-E | 4.6 μM |

Tabelle 2: Hemmung unterschiedlicher CFU-Kolonien durch Lenalidomid und Adriamycin als Einzelsubstanzen (dargestellt ist der IC₅₀-Wert, der nach der Reed und Muench-Methode berechnet wurde). Eigene Darstellung in Anlehnung an [156]. BFU-E (Burst forming unit erythroid), CFU (Colony forming unit), CFU-GM (CFU-granulocyte macrophage), IC (inhibitory concentration), NR (not reached)

Abbildungen 17 und 18 stellen die Hemmung der unterschiedlichen CFU-Kolonien durch Lenalidomid und Adriamycin als Einzelsubstanzen dar. Die Versuche (jeweils in Triplicates durchgeführt und ausgewertet) mit Lenalidomid erfolgten an PB HPZ ohne vorherige CD34⁺-Zellselektion (3 Spender) und an KM HPZ (1 Spender). Adriamycin wurde an PB HPZ ohne vorherige CD34⁺-Zellselektion (5 Spender) untersucht. Neben dem Verhältnis der Absolutzahlen zwischen CFU-GM und BFU-E-Kolonien (Abbildungen 17B und 18D) zeigen die Diagramme die Mittelwerte (+SD) der CFU-Kolonien bei verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle mit den IC₅₀-Werten (Tabelle 2). Selbst bei einer Lenalidomidkonzentration von 10 µM wurde die IC₅₀ bei den CFU-GM nicht erreicht (NR) (Tabelle 2). Die in Abbildungen 17 und 18 mit * gekennzeichneten Werte ergaben im Vergleich zur Negativkontrolle einen p-Wert von p<0.05 und zeigten somit eine statistische Signifikanz.

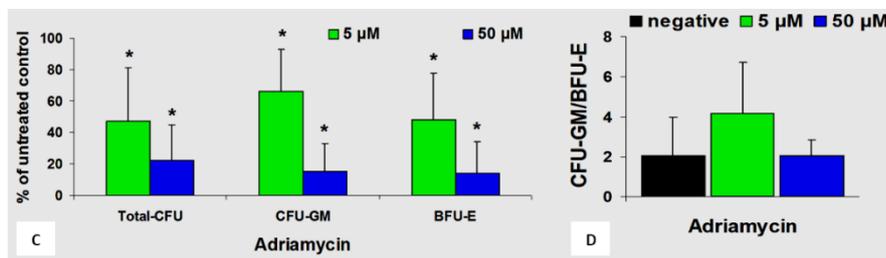


Abbildung 18: CFU-Hemmung durch Adriamycin nach [156] (Erläuterung siehe Text). BFU-E (Burst forming unit erythroid), CFU (Colony forming unit), CFU-GM (CFU-granulocyte macrophage), *p<0.05

Abbildung 19 stellt die Ergebnisse der Kombination von Perifosin und Lenalidomid bei CD34⁺-HPZ von 3 Spendern, die in Triplicates pro untersuchter Konzentration ausgewertet wurden, dar. Es wurden die Effekte zweier Substanzkombinationen unterschiedlicher Konzentration von Perifosin und Lenalidomid auf die Gesamt-CFU ausgewertet. In der Abbildung sind die gemessenen fraktionellen Hemmungen (FA / fractions affected = Anteil an der Gesamtheit der Zellen, die von der Wirkstoffkonzentration beeinflusst werden) bei Kombination der Wirkstoffe Perifosin und Lenalidomid bei ihrem Einsatz als Einzelsubstanzen und der Unterschied der FA zwischen Kombination und einzelner Wirkstoffeinsatz graphisch dargestellt (Mittelwerte + SD). (-) Perifosin + Lenalidomid (rot) zeigt den Unterschied zwischen der gemessenen FA der Kombination und der berechneten Summe der FA der einzelnen Wirkstoffe. Dabei ergab sich zwischen den 2 untersuchten Wirkstoffkombinationen kein signifikanter Unterschied. Insgesamt lässt sich zu den Ergebnissen der Kombinationsversuche sagen, dass sich obwohl sich keine statistische Signifikanz belegen ließ, bei der Kombination verschiedener Konzentrationen von Perifosin und Lenalidomid ein Trend zur antagonistischen Hemmung (<0: Antagonismus, 0: additiv, >0 Synergismus) der CFU-Bildung zeigte (Abbildung 19). Die Kombinationsversuche

von Perifosin und Adriamycin in verschiedenen Konzentrationen zeigten ebenfalls die Tendenz, die CFU-Bildung antagonistisch zu hemmen.

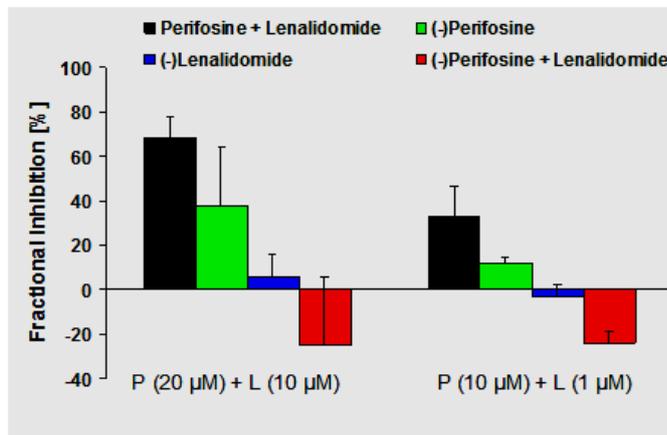


Abbildung 19: Ergebnisse der Kombination von Perifosin (P) und Lenalidomid (L) nach [156] (Erläuterung siehe Text). (-) Perifosin und + Lenalidomid (rot) zeigen den Unterschied zwischen der gemessenen FA (fraktionelle Hemmung) der Kombination und der berechneten Summe der FA der einzelnen Wirkstoffe

Zusammenfassend lässt sich zu den CFU-Versuchen mit Perifosin, Bortezomib, Lenalidomid und Adriamycin als Einzelsubstanzen sagen, dass die Wirkstoffe konzentrationsabhängig die Bildung der Gesamt-CFU sowie CFU-Untertypen hemmten (Tabellen 1 und 2 sowie Abbildungen 15 bis 18). Perifosin hemmte hauptsächlich die CFU-GM und zu einem geringeren Anteil die Bildung von BFU-E, insbesondere in höheren Konzentrationen. Demgegenüber hemmten die anderen Wirkstoffe überwiegend die Bildung von BFU-E. Infolgedessen war der Mittelwert des Verhältnisses der absoluten Kolonien-Anzahl von CFU-GM und BFU-E durch Perifosin in höherer Konzentration deutlich verringert. Dieses Verhältnis war nach Inkubation mit Lenalidomid erhöht und von Adriamycin nicht wesentlich beeinflusst (Abbildungen 17 und 18). Bortezomib zeigte in den Konzentrationen von 5 nM, 10 nM und 20 nM im Vergleich zur Negativkontrolle (0.9, SD 0.3, n=17) keine signifikanten Effekte auf den Mittelwert des Verhältnisses der absoluten Kolonien-Anzahl von CFU-GM und BFU-E (0.9, SD 0.3, n=11; 1.2, SD 0.7, n=15 und 2.5, SD 2.7, n=4). Darüber hinaus wurde die Bildung von CFU-GEMM durch alle Wirkstoffe gehemmt, obwohl dieser CFU-Untertyp in allen Proben und auch in der Negativkontrolle in nur niedriger Kolonien-Anzahl (<5) vorkam. Daher konnte CFU-GEMM für die „inhibitory concentration“ (IC)-Auswertung nicht berücksichtigt werden. Die Bildung der CFU-GEMM-Kolonien-Anzahl im Vergleich zur Negativkontrolle wurde bei einer Inkubation mit 10 µM und 50 µM Perifosin zu 42% (SD 20%, n=8) und 5% (SD 13%, n=9), zu 48% (SD 45%, n=15) und 3% (SD 6%, n=6) bei Inkubation mit 10 nM und 20 nM Bortezomib und zu 50% (SD 35%, n=3) und 15% (SD 13%, n=3) bei Inkubation mit 1 µM und 10 µM Lenalidomid gehemmt. Perifosin zeigte tendenziell, dass die CFU-Bildung aus KM HPZ oder PB HPZ ohne

vorherige CD34⁺-Zellselektion stärker als bei CD34⁺-selektierten PB HPZ gehemmt wurde (Abbildung 16).

4.2 Trypanblaumessungen

4.2.1 Hämatopoetische Progenitorzellen gesunder Spender

Nach 24 Std. Inkubation von PB HPZ mit Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid als Einzelsubstanzen zeigte sich insgesamt eine geringfügige bis mäßige Abnahme der Zellvitalität. Nach Inkubation mit 20 µM Perifosin sah man im Vergleich zur Negativkontrolle, bei der die Vitalitätsrate bei 93% (SD 3%, n=4) lag, eine mittlere Vitalitätsrate von 79% (SD 9%). Die mittlere Vitalitätsrate betrug nach Inkubation mit 5 nM und 20 nM Bortezomib 67% (SD 16%) und 57% (SD 20%) und bei der entsprechenden Negativkontrolle 91% (SD 5%, n = 5). Die Inkubation mit 1 µM Lenalidomid wies eine mittlere Vitalitätsrate von 73% (SD 23%) im Vergleich zu 92% (SD 4%, n=5) bei der Negativkontrolle auf. Nach 48 Std. Inkubation mit den oben genannten Wirkstoffen als jeweils eingesetzte Einzelsubstanz konnte eine weitere moderate Abnahme der Zellvitalitätsrate im Vergleich zur jeweiligen Negativprobe beobachtet werden.

4.2.2 Maligne Zelllinien

Tabelle 3 zeigt die zytotoxischen Effekte von Perifosin und Bortezomib auf Zellen maligner Zelllinien nach 24 Std. und 48 Std. Inkubation mit den entsprechenden IC₅₀-Werten (Auswertung von Triplicates). Die IC₅₀-Werte wurden nach der Reed und Muench-Methode anhand der ausgewerteten Vitalitätsraten nach Inkubation mit den in Tabelle 3 angegebenen Wirkstoffkonzentrationen berechnet.

| Zelllinie | Inkubation (Std.) | Wirkstoff | IC ₅₀ | Wirkstoff | IC ₅₀ |
|-----------|-------------------|-------------------|------------------|--------------------|------------------|
| U266 | 24 | Perifosin [µM] | >80* | Bortezomib [nM] | >40 |
| | 48 | | >80 | | 9.2 |
| DOHH-2 | 24 | | 42.0 | | 19.0 |
| | 48 | | 24.1 | | 5.9 |
| KMH-2 | 24 | | 48.8 | | >20 |
| | 48 | | 33.7 | | 17.4 |
| HL-60 | 24 | | >40 | | 40.0 |
| | 48 | | 13.3 | | 6.1 |
| K562 | 24 | | >40 | | >40 |
| | 48 | | >40 | | 34.5 |
| RPMI-8226 | 24 | | 42.4 | | >10 |
| | 48 | | n.t. | | n.t. |

Tabelle 3: Wirkungen von Perifosin und Bortezomib auf die Zellvitalität (Erläuterung siehe Text). Eigene Darstellung in Anlehnung an [157]. Bei dem mit einem * gekennzeichneten Wert ist die höchste Wirkstoffkonzentration angegeben, bei welcher der IC₅₀-Wert nicht erreicht wurde. IC (inhibitory concentration), n.t. (not tested)

Abbildung 20 stellt die Wirkungen von Perifosin und Bortezomib als Einzelsubstanzen nach 24 Std. Inkubation im Vergleich zur Negativkontrolle dar (Mittelwerte und SD der untersuchten Triplicates).

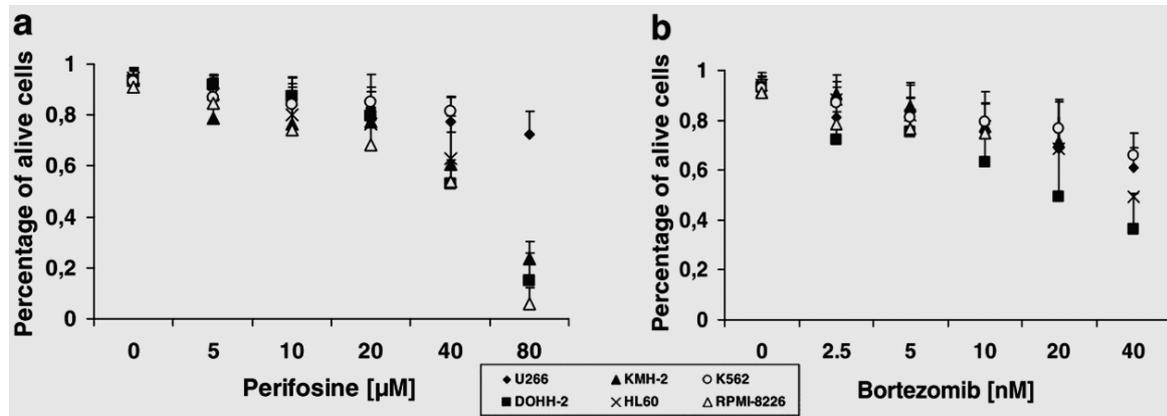


Abbildung 20: Wirkungen von Perifosin und Bortezomib als Einzelsubstanzen auf verschiedene Zelllinien (Erläuterung siehe Text). Eigene Darstellung in Anlehnung an [157]

Lenalidomid als Einzelsubstanz zeigte sowohl bei 24 Std. als auch bei 48 Std. Inkubation eine geringe zytotoxische/antiproliferative Wirkung. Bei den Lenalidomidversuchen mit einer Maximalkonzentration von 10 µM lag die durchschnittliche Vitalitätsrate bei weniger als 10% Unterschied zur Negativkontrolle mit $\geq 80\%$.

Tabelle 4 und Abbildung 21 geben die mit der CalcuSyn-Software berechneten Effekte der Wirkstoffkombination von Perifosin und Bortezomib mit dem beurteilenden CI und der SD für die unterschiedlichen FA wieder. Die kombinierten zytotoxischen Effekte von Perifosin und Bortezomib bei KMH-2 und HL-60 Zellen wurden mittels Trypanblaufärbung (Vitalitätsrate) ausgewertet.

| Zelllinie | Inkubation | FA | CI | SD |
|-----------|--------------------------|------|------|------|
| KMH-2 | 24 Std. (Triplicates) | 0.25 | 1.13 | 0.23 |
| | | 0.50 | 0.74 | 0.26 |
| | | 0.75 | 0.48 | 0.25 |
| | 48 Std. (Triplicates) | 0.25 | 1.24 | 0.18 |
| | | 0.50 | 0.90 | 0.22 |
| | | 0.75 | 0.66 | 0.24 |
| HL-60 | 24 Std. (Quadruplicates) | 0.25 | 0.81 | 0.12 |
| | | 0.50 | 0.42 | 0.12 |
| | | 0.75 | 0.22 | 0.10 |

Tabelle 4: Wirkungen von Perifosin und Bortezomib auf die Zellvitalität (Erläuterung siehe Text). Eigene Darstellung in Anlehnung an [157]. CI (combination index), FA (fractions affected), SD (standard deviation)

Die Berechnungen erfolgten auf Basis der FA der einzelnen Substanzen und ihrer Kombinationen, die mittels Trypanblau nach 24 Std. und 48 Std. Inkubation ausgewertet wurden. Die Maximalkonzentrationen von Perifosin und Bortezomib betragen 60 μM und 20 nM bei Versuchen mit KMH-2 Zellen und 30 μM bzw. 10 nM bei HL-60 Zellen, jeweils gefolgt von 4 weiteren Konzentrationsreihen mit Verdünnungsschritten von 1:1.5. Bei KMH-2 Zellen lag der CI nach 24 Std. Inkubation bei einer FA von >0.3 bei <1 und bei einer FA mit Werten von ≤ 0.3 bei >1 . Nach 48 Std. Inkubation lagen die CI-Werte bei einer FA von >0.4 bei <1 und bei einer FA von ≤ 0.4 bei >1 . Bei HL-60 Zellen lag der CI bei einer FA von >0.15 bei <1 und bei einer FA von ≤ 0.15 bei >1 . In Abbildung 21 (a-c) sind nach 24 Std. Inkubation die Effekte der Kombination von Perifosin und Bortezomib, die bei den KMH-2 Zellen in Triplicates untersucht wurden, genauer dargestellt.

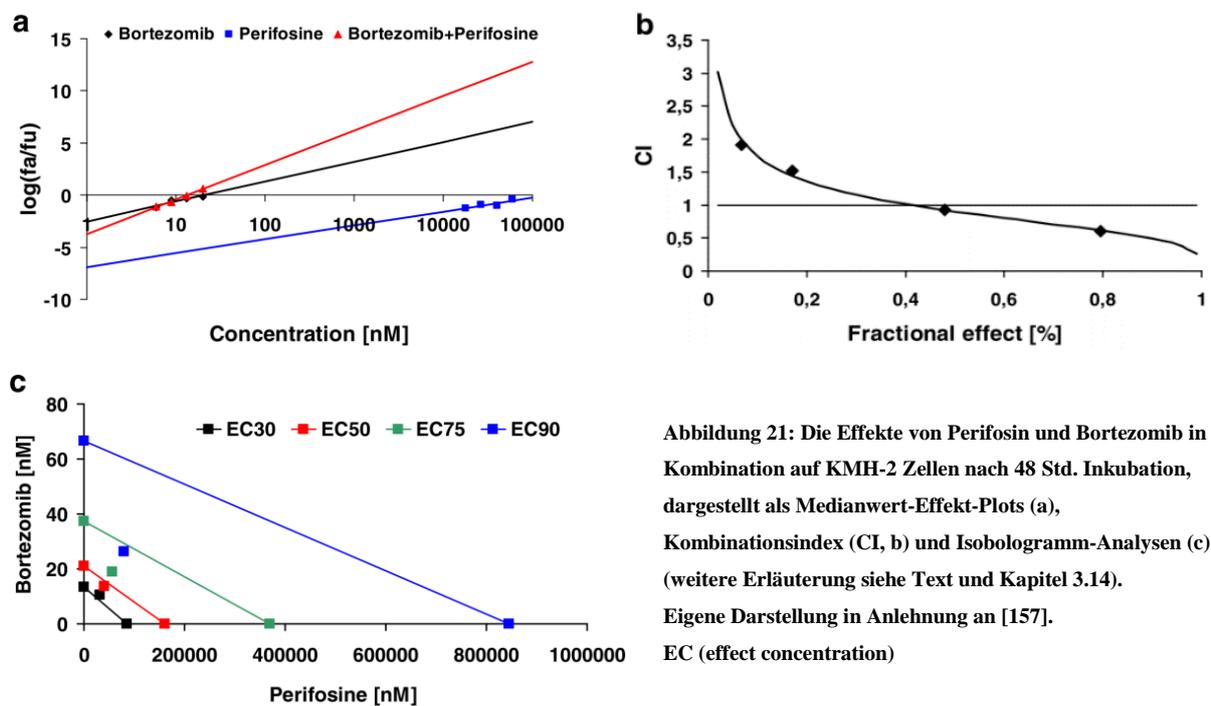


Abbildung 21: Die Effekte von Perifosin und Bortezomib in Kombination auf KMH-2 Zellen nach 48 Std. Inkubation, dargestellt als Medianwert-Effekt-Plots (a), Kombinationsindex (CI, b) und Isobologramm-Analysen (c) (weitere Erläuterung siehe Text und Kapitel 3.14). Eigene Darstellung in Anlehnung an [157]. EC (effect concentration)

Es sind sogenannte Medianwert-Effekt-Plots dargestellt, welche die FA und „Fractions unaffected“ (FU = den durch die Wirkstoffkonzentration nicht beeinflussten Anteil an der Gesamtheit der Zellen) (siehe a), CI (siehe b) und Isobologramm-Analysen (siehe c) zeigen. Die Isobologramme stellen unterschiedlich kalkulierte EC der Wirkstoffkombinationen, die auf Basis der zytotoxischen Effekte der Einzelsubstanzen (siehe Linien Abbildung 21a) im Vergleich zur Kombination (Quadrate) berechnet wurden, dar. CI-Werte unter 1 werden durch Quadrate zwischen dem Schnittpunkt der Achsen und der entsprechenden Linie angezeigt, CI-Werte gleich 1 durch Quadrate auf den Linien und CI-Werte über 1 werden durch alle Quadrate

angezeigt, die nicht in den bereits beschriebenen Bereichen liegen. Kombinationseffekte auf der Basis von CI wurden wie folgt klassifiziert: <0.90 : Synergismus, $0.90-1.10$: Additiv und >1.10 : Antagonismus (siehe Kapitel 3.14). Insgesamt ließen die Ergebnisse der CI im Rahmen der Trypanblaumessungen den Trend erkennen, dass Perifosin und Bortezomib in Kombination größtenteils additiv bzw. synergistisch agierten.

4.3 Durchflusszytometrie

4.3.1 Hämatopoetische Progenitorzellen gesunder Spender

Abbildung 22 stellt repräsentativ einen Versuchsansatz dar.

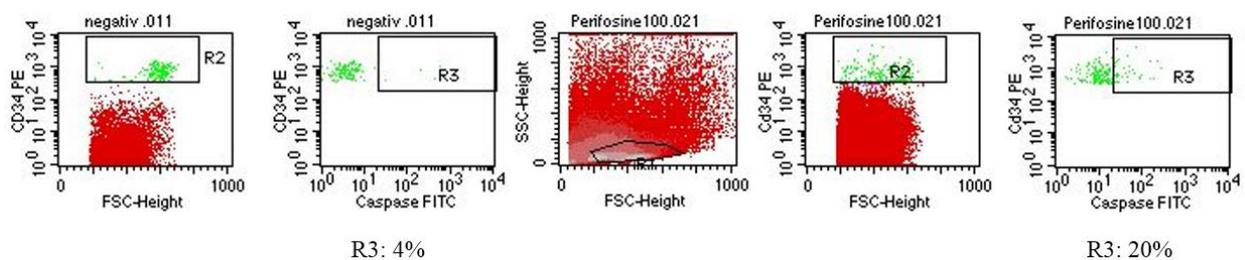


Abbildung 22: Sensitivität von Stammzellen gegenüber Perifosin im Apoptoseassay (nicht vorbehandeltes Stammzellapheresat). Repräsentative Darstellung eines Versuchsansatzes (Positivkontrolle: Zelllinie DOHH-2, grün dargestellt: CD34⁺-hämatopoetische Progenitorzellen)

Abbildung 23 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der ersten fünf Versuchsansätze der Wirkung von Perifosin auf CD34⁺-Stammzellen. Bei drei dieser Versuchsansätze erfolgte zunächst eine CD34⁺-Zellselektion und anschließend die Inkubation mit Perifosin über 24 Std. oder 48 Std. (Abbildung 23 A-C). Bei allen drei Versuchen zeigte sich bis zu einer Perifosinkonzentration von 10 µM/L eine geringe Reduktion Caspase- und PI-negativer, d.h. vitaler, nicht-apoptotischer Zellen ($<10\%$ im Vergleich zur Negativkontrolle). Bei der höchsten untersuchten Perifosinkonzentration von 100 µM/L waren in den drei Versuchen noch 2%, 35% und 38% der Zellen Caspase- und PI-negativ, wobei der Anteil apoptotischer und/oder nekrotischer Zellen zunahm. CD34⁺-selektierte Stammzellen wiesen gegenüber Bortezomib bei allen untersuchten Konzentrationen sowohl nach 24 Std. als auch 48 Std. Inkubation nur eine geringe Sensitivität auf (Abbildung 23 D und E).

Zusätzlich wurde bei zwei Experimenten die Induktion der Apoptose durch Perifosin und Bortezomib gegenüber CD34⁺-Zellen im nicht-zellselektierten „Buffy coat“ Präparat untersucht. Bei der höchsten Perifosinkonzentration von 100 µM/L bzw. 80 µM/L waren 20% bzw. 22% der CD34⁺-Zellen Caspase-positiv, d.h. apoptotisch (siehe exemplarisch Abbildung 22). Bei der

höchsten untersuchten Bortezomibkonzentration von 40 nM/L waren in einem der Experimente 26% und in dem anderen 9% der CD34⁺-Zellen apoptotisch.

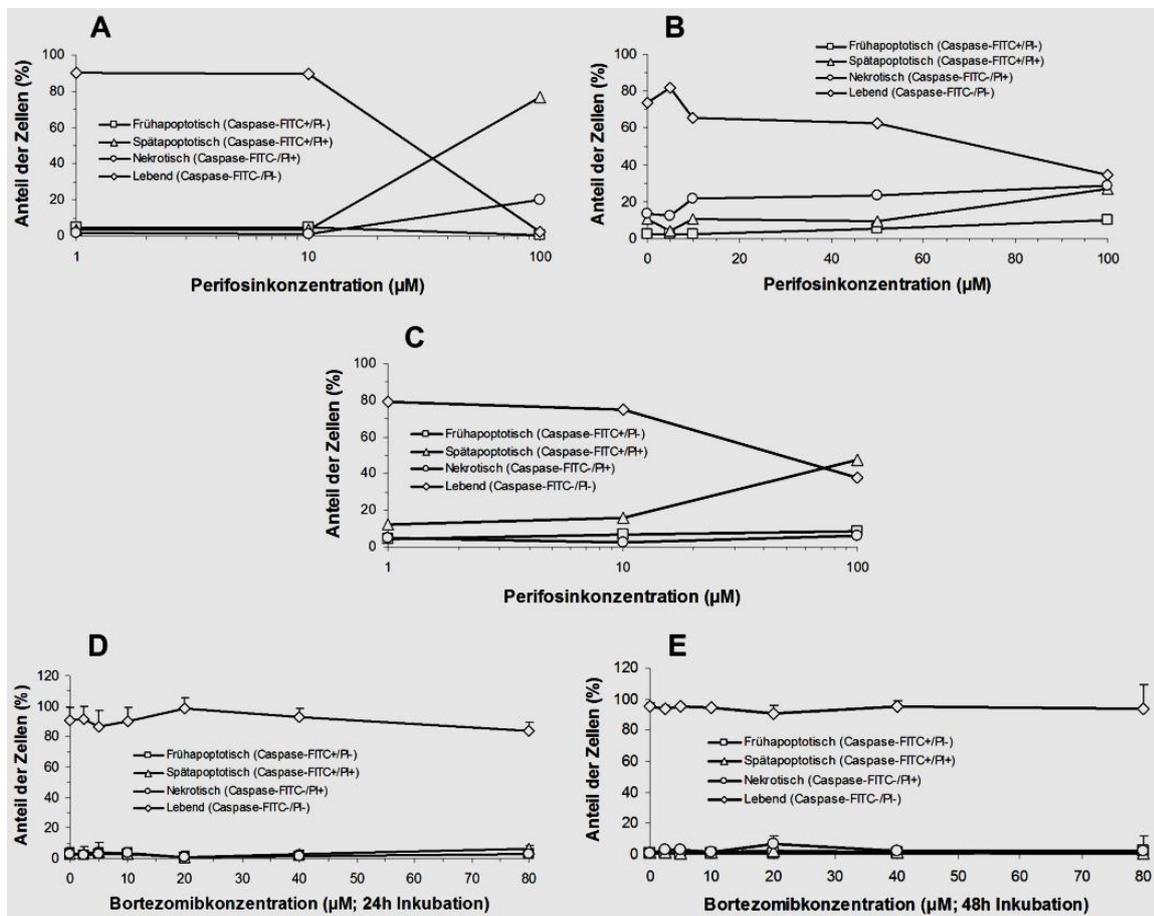


Abbildung 23: Sensitivität von Stammzellen im Apoptoseassay gegenüber Perifosin und Bortezomib nach vorheriger CD34⁺-Zellselektion. Abbildung 23 A und B zeigt je einen Versuchsansatz nach 24 Std. Inkubation mit Perifosin, Abbildung 23 C nach 48 Std. Inkubation. Abbildung 23 D und E zeigt die Sensitivität von CD34⁺-selektierten Stammzellen gegenüber Bortezomib nach 24 Std. (n=4) bzw. 48 Std. Inkubation (Mean + Standard deviation, n=3)

Perifosin führte im Apoptoseassay bei CD34⁺-selektierten Stammzellen oder bei nicht-vorbehandelten „Buffy coat“-Präparaten konzentrationsabhängig zur Induktion der Apoptose. Dabei war die Empfindlichkeit von CD34⁺-selektierten Stammzellen gegenüber Perifosin bei Konzentrationen bis 10 µM/L gering. Messungen bei höheren Perifosinkonzentrationen bis 100 µM/L zeigten jedoch variierende Ergebnisse (Induktion von Apoptose und/oder Nekrose bei 20-100% der Zellen). Bortezomib zeigte demgegenüber bei allen untersuchten Konzentrationen sowohl nach 24 Std. als auch nach 48 Std. Inkubation der CD34⁺-selektierten Stammzellen nur eine geringe Zytotoxizität.

In Abbildung 24 ist ein repräsentatives Beispiel für einen mittels Durchflusszytometrie durchgeführten Caspase-Assay dargestellt. Zunächst erfolgte eine 3-fach Immunfärbung, nachdem PB HPZ (ohne vorherige CD34⁺-Zellselektion) mit den jeweiligen Substanzen 24 Std.

lang im Brutschrank inkubiert wurden. Abbildung 24 A und B zeigt die Negativkontrolle. Abbildung 24 C-E zeigt die Dichteplots der Progenitoren, die mit Perifosin (C), Bortezomib (D) und Lenalidomid (E) inkubiert wurden. HL-60 Zellen mit Apoptoseinduktion durch Bortezomib dienten als Positivkontrolle (Abbildung 24 F).

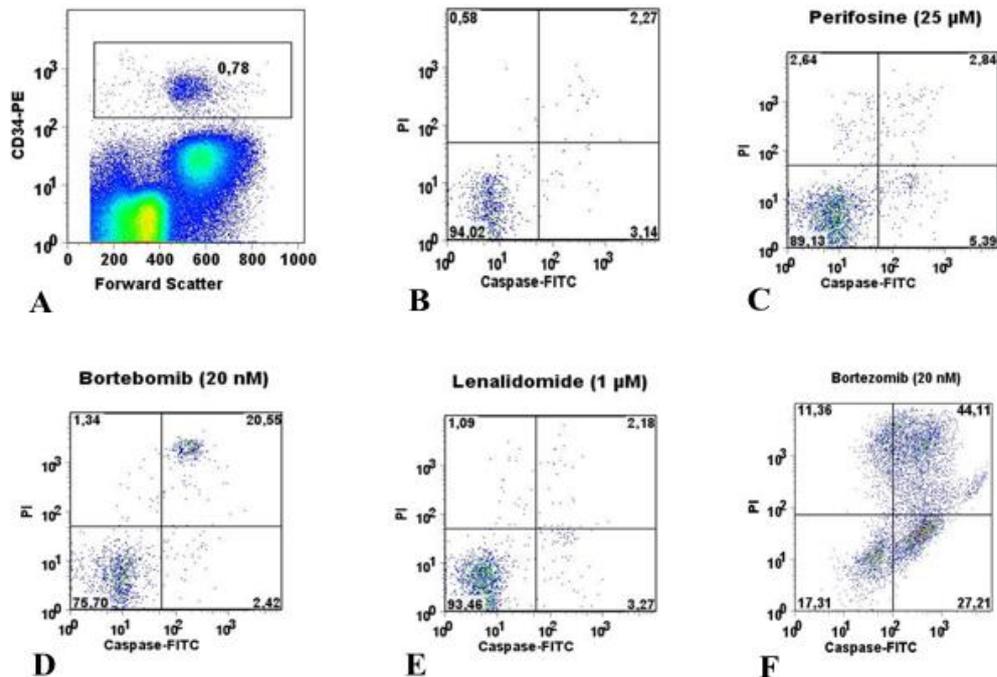


Abbildung 24: Effekte von Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid als Einzelsubstanzen. Die Plots stellen den Anteil vitaler (Caspase-FITC⁻/PI⁻), frühapoptotischer (Caspase-FITC⁺/PI⁻), spätapoptotischer (Caspase-FITC⁺/PI⁺) und nekrotischer Zellen (Caspase-FITC⁻/PI⁺) dar (Farben stellen Zelldichten dar, weitere Erläuterung siehe Text). Eigene Darstellung in Anlehnung an [156]

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen zeigten nach 24 Std. Inkubation mit 10 µM Perifosin eine leichte Reduzierung der Caspase⁻/PI⁻ vitalen CD34⁺-selektierten PB HPZ (Auswertung von Triplicates) mit einem Mittelwert von 77% gegenüber 80% der Negativkontrolle und SD von 4.7% und 10.1%. Darüber hinaus zeichnete sich bei den PB HPZ eines exemplarischen Spenders nach 24 Std. Inkubation mit Perifosin in höheren Konzentrationen von bis zu 40 µM (74% bei 40 µM vs. 81% für die Negativkontrolle) kein signifikanter Einfluss auf den prozentualen Anteil der Annexin-V⁻/PI⁻ vitalen Zellen ab. Um bei den Apoptose-Assays einen Einfluss der CD34⁺-Zellselektion auf den Anteil vitaler Zellen auszuschließen, untersuchten wir nach Inkubation mit den verschiedenen Wirkstoffen mithilfe der 3-fach Immunfärbung auch die aktivierten Caspasen der PB HPZ ohne vorherige CD34⁺-Zellselektion. Diese Experimente bestätigten die Beobachtungen (wie auch in Abbildung 24 ersichtlich), da der Mittelwert der Caspase⁻/PI⁻ vitalen Zellen nach 24 Std. Inkubation mit steigenden Perifosinkonzentrationen von bis zu 50 µM bei ≥ 87% lag (SD 0.1% vs. 90%, SD

0.2% für die Negativkontrolle, bei Auswertung von Duplicates). Sowohl Bortezomib als auch Lenalidomid zeigten bei den Assays nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (entweder 24 Std. und/oder 48 Std.) mäßige Wirkungen auf den Anteil vitaler Zellen. Auch höhere Bortezomibkonzentrationen führten bei Mittelwerten von 87% (SD 5.5% vs. 90%, SD 9% bei der Negativkontrolle) und 85% (SD 16% vs. 95%, SD 2% bei der Negativkontrolle) mit der höchsten Konzentration von 80 nM nach 24 Std. und 48 Std. Inkubation (nach Auswertung von mindestens drei gleichen Versuchsansätzen der jeweils entsprechenden Wirkstoffkonzentration) zu einer geringen Reduktion Caspase⁻/PI⁻ vitaler CD34⁺-selektierter PB HPZ. Bei PB HPZ ohne vorheriger CD34⁺-Zellselektion und 3-fach Immunfärbung war nach 24 Std. Inkubation mit Bortezomib der Mittelwert apoptotischer und nekrotischer Zellen ebenfalls gering (lebende Zellen 81%, SD 2% bei der maximalen Konzentration von 80 nM im Vergleich zu 91%, SD 0% Negativkontrolle, ausgewertete Triplicates, Abbildung 24). Eine 24 Std. Inkubation mit 10 µM Lenalidomid führte ebenfalls zu geringen bis moderaten Mittelwerten vitaler Caspase⁻/PI⁻-Zellen (83%, SD 5.1% vs. 91%, SD 0% Negativkontrolle, bei Auswertung von Duplicates, Abbildung 24). Im Annexin-V-Assay zeigte 1 µM Lenalidomid auf den Anteil vitaler CD34⁺-selektierter PB HPZ ebenfalls Wirkung (75% vs. 81% Negativkontrolle).

4.3.2 Maligne Zelllinien

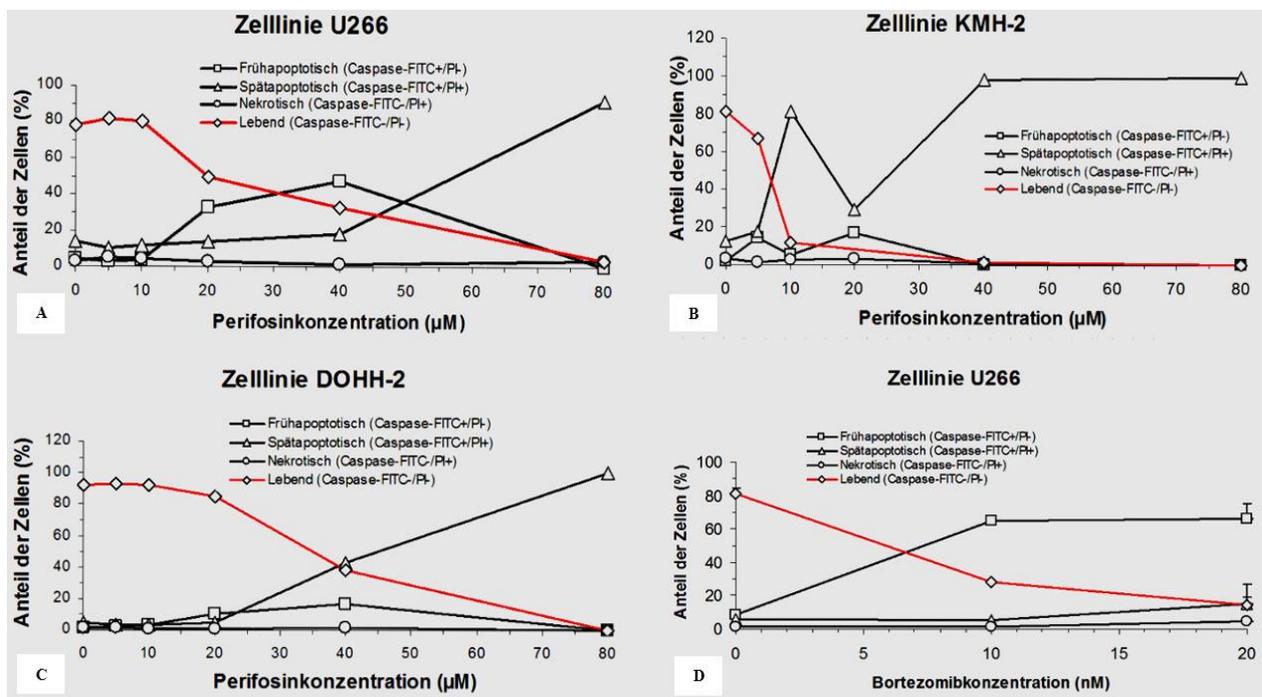


Abbildung 25: Sensitivität von Kulturzellen gegenüber Perifosin und Bortezomib (rot: vitale Zellen). A-C zeigt exemplarisch eine Versuchsreihe an verschiedenen Zelllinien nach 24 Std. Perifosininkubation. D zeigt die Sensitivität von Zellen der Zelllinie U266 nach 24 Std. Bortezomibinkubation (Mean + Standard deviation; n=3)

Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse der ersten drei Versuchsansätze mit der konzentrationsabhängigen Wirkung von Perifosin auf die MM-Zelllinie U266 und auf die Lymphomzelllinien DOHH-2 und KMH-2 (siehe repräsentative Abbildung 25 A-C). Hierbei betrug die IC₅₀ ca. 20 µM/L für U266, sowie ca. 7.5 µM/L und 35 µM/L für die Zelllinien KMH-2 und DOHH-2 (bezogen auf lebende Zellen im Vergleich zu apoptotischen und nekrotischen Zellen). Bortezomib führte bei Zellen der Zelllinie U266 zur Induktion von Apoptose und Nekrose (IC₅₀ bzgl. lebender Zellen ca. 7.5 nM/L, n=3, Abbildung 25 D).

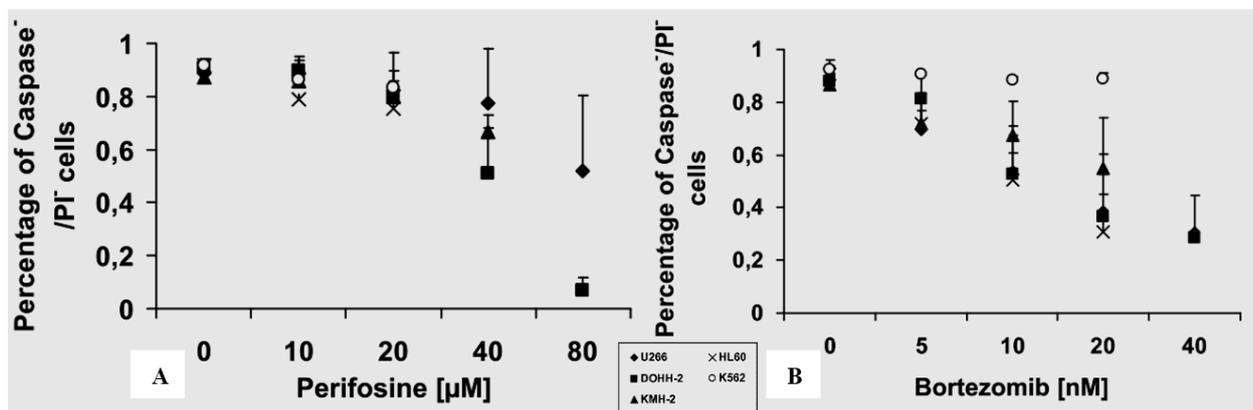


Abbildung 26: Effekte von Perifosin (A) und Bortezomib (B) als Einzelsubstanzen nach 24 Std. Inkubation mit dem durchflusszytometrischen Nachweis aktivierter Caspasen. Ergebnisse dargestellt als Mittelwerte mit SD (weitere Erläuterung siehe Text). Eigene Darstellung in Anlehnung an [157]

| Wirkstoff | Zelllinie | Inkubation (Std.) | IC ₅₀ | Wirkstoff | IC ₅₀ |
|-------------------|-----------|-------------------|------------------|--------------------|------------------|
| Perifosin [µM] | U266 | 24 | >80* | Bortezomib [nM] | 12.0 |
| | | 48 | 55.1 | | 2.1 |
| | DOHH-2 | 24 | 47.0 | | 11.4 |
| | | 48 | 21.6 | | 4.4 |
| | KMH-2 | 24 | >40 | | >20 |
| | | 48 | n.t. | | n.t. |
| | HL-60 | 24 | >20 | | 10.4 |
| | | 48 | n.t. | | n.t. |
| | K562 | 24 | >20 | | >20 |
| | | 48 | n.t. | | n.t. |
| | RPMI-8226 | 24 | n.t. | | n.t. |
| | | 48 | n.t. | | n.t. |

Tabelle 5: Zytotoxizität von Perifosin und Bortezomib im Caspase-Assay (Erläuterung siehe Text). Bei dem mit einem * gekennzeichneten Wert ist die höchste Wirkstoffkonzentration angegeben, unter welcher der IC₅₀-Wert nicht erreicht wurde. Eigene Darstellung in Anlehnung an [157]. IC (Inhibitory concentration), n.t. (not tested)

Nach Auswertung aller Versuche sind die Ergebnisse als IC₅₀-Werte (mit der Reed und Muench-Methode aus Mittelwerten mit SD der ausgewerteten Triplicates lebender Zellen berechnet) bei verschiedenen Zelllinien und Inkubationszeiten mit Perifosin oder Bortezomib in Abbildung 26

und Tabelle 5 im Vergleich zur Negativkontrolle nach 24 Std. Inkubation mit dem Nachweis aktivierter Caspasen zusammengefasst dargestellt.

Abbildung 27 zeigt eine repräsentativ ausgewählte Darstellung von Apoptose und Nekrose in HL-60 Zellen nach 24 Std. Inkubation mit Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid.

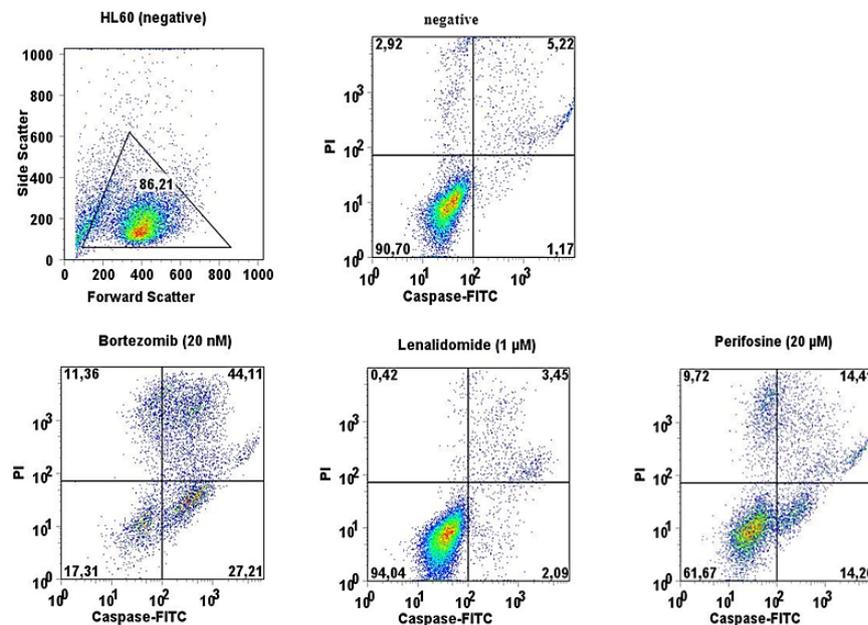


Abbildung 27: Exemplanische Darstellung von HL-60 Zellen nach 24 Std. Inkubation mit Bortezomib, Lenalidomid und Perifosin. Eigene Darstellung in Anlehnung an [157]. Die Plots stellen den Anteil vitaler (Caspase-FITC/PI⁻), frühapoptotischer (Caspase-FITC⁺/PI⁻), spätapoptotischer (Caspase-FITC⁺/PI⁺) und nekrotischer Zellen (Caspase-FITC/PI⁺) dar (Farben stellen Zelldichte dar, weitere Erläuterung siehe Text)

Eine 24 Std. Inkubation mit Lenalidomidkonzentrationen von bis zu maximal 10 µM zeigte nur eine geringe Caspaseaktivität mit einer mittleren Vitalitätsrate von $\geq 89\%$ bei U266, DOHH-2 und HL-60 Zellen. Nach 48 Std. Inkubation zeigten alle Ansätze mit

Lenalidomidkonzentrationen von bis zu maximal 1 µM eine mittlere Vitalitätsrate von $\geq 82\%$ bei U266 und DOHH-2 Zellen mit maximal 10%iger Abweichung von den Negativkontrollen (siehe repräsentatives Beispiel Abbildung 27).

Tabelle 6 gibt die mit der CalcuSyn-Software berechneten Effekte der Wirkstoffkombination von Perifosin und Bortezomib auf HL-60 Zellen nach 24 Std. Inkubation und nachfolgender Messung mittels Caspase-Assay in der Durchflusszytometrie mit dem beurteilenden CI und der SD für die unterschiedlichen FA wieder. Die Effekte von Perifosin und Bortezomib wurden auf Basis der FA der einzelnen Substanzen und ihrer Kombinationen berechnet. Die Maximalkonzentrationen von Perifosin und Bortezomib betragen bei den HL-60 Zellen 30 µM bzw. 10 nM jeweils gefolgt von vier weiteren 1:1.5 Verdünnungsschritten. Die simulierten CI von HL-60 Zellen lagen bei

Perifosin in Kombination mit Bortezomib für FA-Werte von >0.15 bei <1 und für FA-Werte von ≤ 0.15 bei >1 . Auch die Ergebnisse der CI der durchflusszytometrischen Messung bei HL-60 Zellen ließen den Trend erkennen, dass Perifosin und Bortezomib in Kombination größtenteils additiv bzw. synergistisch agieren.

| Zelllinie | Inkubation | FA | CI | SD |
|-----------|-----------------------|------|------|------|
| HL-60 | 24 Std. (Triplicates) | 0.25 | 0.73 | 0.12 |
| | | 0.50 | 0.46 | 0.13 |
| | | 0.75 | 0.31 | 0.14 |

Tabelle 6: Kombinationseffekte von Perifosin und Bortezomib im Caspase-Assay (Erläuterung siehe Text). Eigene Darstellung in Anlehnung an [157]. CI (combination index), FA (fractions affected), SD (standard deviation)

Mit den Annexin-V-Assays wurde die caspaseunabhängige Apoptoseinduktion untersucht. Nach 24 Std. Inkubation mit 20 μM Perifosin konnten keine oder nur geringe Auswirkungen auf die Mittelwerte von Annexin-V/PI lebenden U266 Zellen (87% vs. 87% Negativkontrolle, SD 5% und 3%, n=3), KMH-2 Zellen (86% vs. 89%, SD 1% und 3%, n=2), HL-60 Zellen (81% vs. 90%, SD 4% und 1%, n=3) und K562 Zellen (88% vs. 91%, SD 1% und 0%, n=3) beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führte bei Annexin-V/PI lebenden U266 Zellen eine 24 Std. Inkubation mit 10 nM Bortezomib im Vergleich zur Negativkontrolle mit einem Mittelwert von 56% (SD 2%, n=3) und bei HL-60 Zellen von 56% (SD 17%, n=2) zu einer deutlichen Wirkung. Die 24 Std. Inkubation mit 1 μM Lenalidomid hatte im Vergleich zur Negativkontrolle keinen signifikanten Einfluss auf Annexin-V/PI lebende U266 Zellen (Mittelwert 85%, SD 2%, n=3) und bestätigte die Ergebnisse der Caspaseansätze.

4.4 Ergebnisse des Hämatologie-Analysegerätes XE-5000

In Abbildung 28 wird repräsentativ der Nachweis (Dot Plots) von Zellen im IMI-Kanal nach 24 Std. Inkubation mit Perifosin (P), Bortezomib (B) und Lenalidomid (L) als Einzelsubstanzen gezeigt. Zellen im IMI-Kanal wurden in den Dot Plots durch Rotfärbung dargestellt. Die x-Achse stellt den DC, die y-Achse die RF dar.

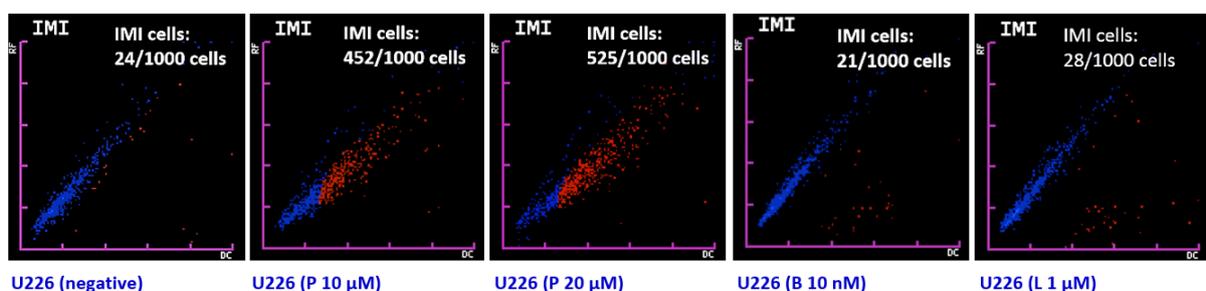


Abbildung 28: Repräsentativ ausgewählte Darstellung der Detektion von Zellen (hier U266) im IMI-Kanal des Analysegerätes XE-5000 nach 24 Std. Inkubation mit Perifosin (P), Bortezomib (B) und Lenalidomid (L). Eigene Darstellung in Anlehnung an [157]. RF (radio frequency), DC (direct current), rote Farbdarstellung (IMI⁺-Zellen)

Abbildung 29 gibt den Anteil der bei den jeweiligen Zelllinien gemessenen IMI⁺-Zellen und die entsprechende Wirkstoffkonzentration als Mittelwert mit SD wieder. Der mit ** gekennzeichnete Wert ergab mit $p < 0.01$ eine statistische Signifikanz (höher im Vergleich zur Negativkontrolle). Der mit ‡ gekennzeichnete Wert markiert eine statistische Signifikanz von $p < 0.05$, die im Vergleich zur Negativkontrolle kleiner war.

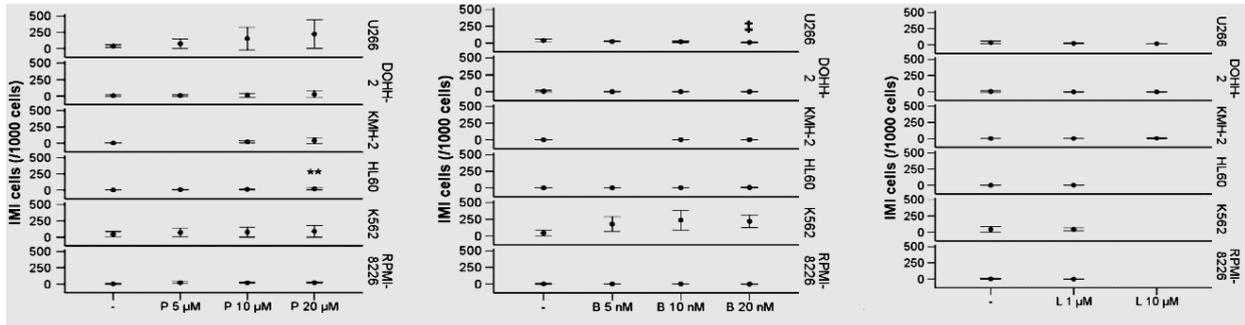


Abbildung 29: Anteil an IMI⁺-Zellen je Wirkstoffkonzentration nach 24 Std. Inkubation. Eigene Darstellung in Anlehnung an [157].
** $p < 0.01$, ‡ $p < 0.05$

Abbildung 30 zeigt in Form von Box Plots den Anteil der gemessenen IMI⁺-Zellen im Bezug zu den eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen gegenüber den verschiedenen Zelllinien (Zusammenfassung aller Ergebnisse). Der mit * gekennzeichnete p-Wert von $p < 0.05$ und der mit ** gekennzeichnete p-Wert von $p < 0.01$ (höher im Vergleich zur Negativkontrolle) wiesen eine statistische Signifikanz auf.

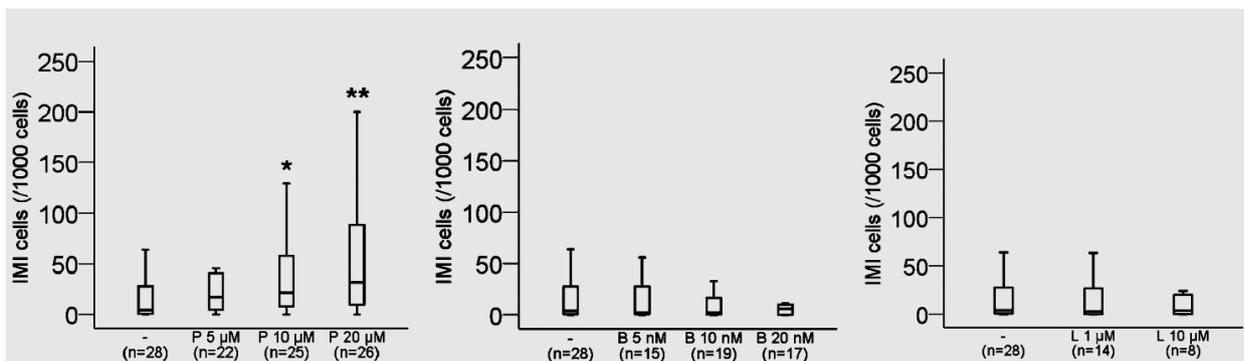


Abbildung 30: Anteil an IMI⁺-Zellen bei ansteigenden Konzentrationen von Perifosin (P), Bortezomib (B) und Lenalidomid (L) nach 24 Std. Inkubation. Eigene Darstellung in Anlehnung an [157]. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Zusammenfassend ergab die Auswertung aller Ergebnisse der am XE-5000 durchgeführten Messungen an den verschiedenen Zelllinien nach 24 Std. Inkubation mit Perifosin (10 und 20 µM) eine signifikante Erhöhung des Anteils an IMI⁺-Kulturzellen ($p = 0.04$ und 0.008). Im Gegensatz dazu zeigten weder Bortezomib noch Lenalidomid einen signifikanten Effekt auf den Anteil der IMI⁺-Zellen (Abbildungen 28 und 30). Die Inkubation mit 20 µM Perifosin führte

ebenfalls zur signifikanten Erhöhung ($p=0.007$) des Anteils an IMI⁺-HL-60 Zellen. Die Inkubation mit 20 nM Bortezomib hingegen führte zur Verringerung des Prozentsatzes der IMI⁺-U266 Zellen ($p=0.02$). Lenalidomid zeigte bei allen Zelllinien keinen signifikanten Einfluss auf den Prozentsatz der IMI⁺-Zellen (Abbildung 29 und 30). Keiner der Wirkstoffe beeinflusste den Mittelwert des DC- oder RF-Parameters.

4.5 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

4.5.1 Hämatopoetische Progenitorzellen gesunder Spender

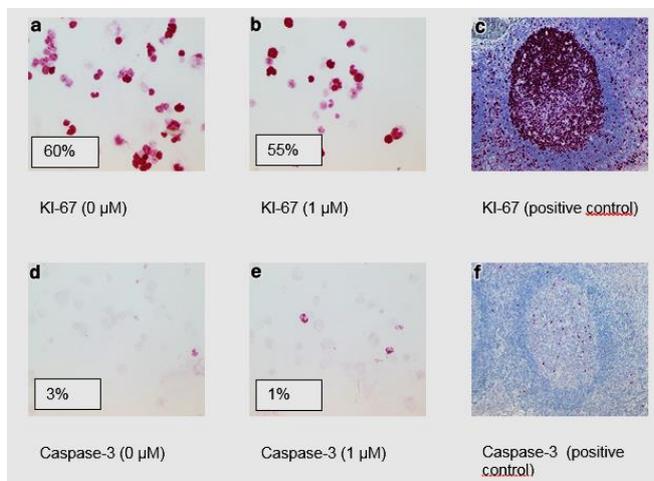


Abbildung 31: Immunhistochemische Präparate von CD34⁺-Zellen nach 24 Std. Inkubation mit Lenalidomid und hyperplastisches Tonsillengewebe als Positivkontrolle. Eigene Darstellung in Anlehnung an [156]

Abbildung 31 zeigt repräsentative Ki-67- (A und B) und Caspase-3 Färbungen (D und E) von CD34⁺-selektierten PB HPZ nach 24 Std. Inkubation mit Lenalidomid (lichtmikroskopische 100-fache Vergrößerung). Als Positivkontrolle wurde ein Präparat mit Tonsillengewebe eingesetzt, welches eine folliculäre Hyperplasie mit einem hohen Ki-67-Proliferationsindex und innerhalb der Keimzentren zahlreiche angeschnittene Caspase-3-positive apoptotische Zellen aufwies (C und F).

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungsansätze (jeweils Triplicates) bei 20 µM Perifosin (29%, SD 18%), 40 µM Perifosin (20%, SD 13%) und 20 nM Bortezomib (31%, SD 20%) als Einzelsubstanzen im Vergleich zur Negativkontrolle (36%, SD 20%) einen leicht verringerten Mittelwert der Ki-67-positiven HPZ. 1 µM Lenalidomid (Abbildung 31) wies nach Auswertung von zwei Präparatreihen (Duplicates) einen moderaten Effekt auf den Mittelwert der Ki-67-positiven HPZ auf (5% und 55% vs. 10% und 60% bei der Negativkontrolle). Caspase-3-Färbungen zeigten nach Auswertung von je zwei Duplicates im Vergleich zur Negativkontrolle (16% und 3%) nach 24 Std. Inkubation mit entweder 20 µM Perifosin (18% und 4%), 20 nM

Bortezomib (20% und 5%) oder 1 μ M Lenalidomid (26% und 1%, Abbildung 31) keinen signifikanten Anstieg der Caspase-3-positiven HPZ.

4.5.2 Maligne Zelllinien

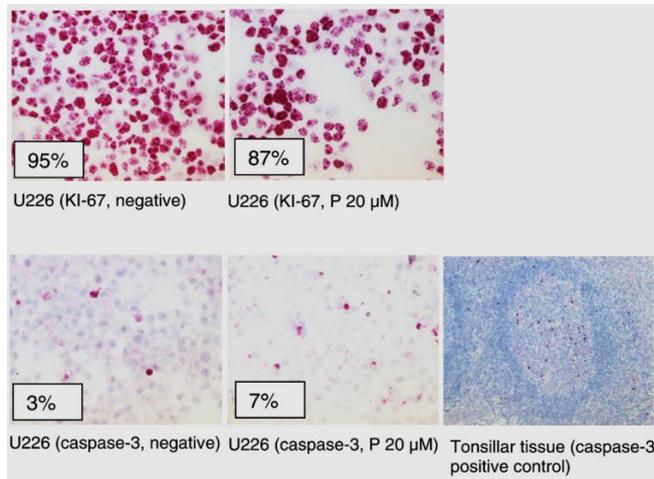


Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung von U266 Zellen mit Perifosin nach 24 Std. Inkubation und Tonsillengewebe als Positivkontrolle. Eigene Darstellung in Anlehnung an [157]

Abbildung 32 veranschaulicht repräsentative Präparate von U266 Zellen (lichtmikroskopische 100-fache Vergrößerung) mit Ki-67- und Caspase-3-Färbungen nach 24 Std. Inkubation mit Perifosin (P) als Einzelsubstanz im Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen ohne Perifosin). Als Positivkontrolle wurde ein Präparat mit Tonsillengewebe eingesetzt, welches innerhalb der Keimzentren eine folliculäre Hyperplasie mit zahlreichen angeschnittenen Caspase-3-positiven apoptotischen Zellen aufwies (lichtmikroskopische 63-fache Vergrößerung).

Zusammenfassend zeigen die Versuchsansätze nach 24 Std. Inkubation mit 2,5 oder 10 μ M Perifosin (95% und 85%, SD 5% und 0%), 2,5 oder 10 nM Bortezomib (90% und 88%, SD 0% und 3%) oder 1 μ M Lenalidomid (80%, SD 5%) im Vergleich zur Negativkontrolle (83%, SD 3%, Auswertung von Duplicates) bei den Mittelwerten von Ki-67-positiven HL-60 Zellen keine signifikanten Unterschiede (genannte Wirkstoffe jeweils als Einzelsubstanz in Triplicates eingesetzt). Bei Caspase-3-positiven K562 Zellen zeigten sich nach 24 Std. Inkubation mit 2,5 und 10 μ M Perifosin Mittelwerte von 2% (SD 1%) und 3% (SD 1%). Die 24 Std. Inkubation mit Bortezomib (2,5 und 10 nM) ergab bei den Caspase-3-positiven K562 Zellen Mittelwerte von 2% (SD 1%) und 5% (SD 0) bei einem Mittelwert der Negativkontrolle von 3% und einer SD von 1%. Nach 24 Std. Inkubation mit Lenalidomid (Auswertung von Duplicates) betrug der Mittelwert von Caspase-3-positiven K562 Zellen 2% (SD 0%) bei einem Mittelwert der Negativkontrolle von 3% und einer SD von 1%. Zusätzlich zur Untersuchung der Wirkung von

Perifosin (20 μM) auf Caspase-3-positive U266 Zellen erfolgten Versuche bezüglich der Wirkungen von Perifosin (10 und 20 μM), Bortezomib (2.5 und 10 nM) und Lenalidomid (1 μM) auf den Mittelwert der Ki-67-positiven U266 Zellen. Es ergab sich keine signifikante Abweichung von den Mittelwerten der jeweiligen Negativkontrolle, wie Abbildung 32 anhand des repräsentativen Beispiels nach Inkubation mit Perifosin verdeutlicht.

5. Diskussion

Perifosin wurde als Vertreter der APL bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt in diversen Phase-I/II- und auch wenigen Phase-III-Studien bei hämatologischen und soliden Malignomen intensiv erforscht [45-117]. Viele der Phase-I/II-Studien zeigten auf, dass Perifosin im Gegensatz zu seinem Vorgänger Miltefosin eine relativ tolerierbare gastrointestinale und deutlich geringere Hämatotoxizität aufweist. Dieser Aspekt machte Hoffnung auf einen vielversprechenden Wirkstoff mit günstigem Toxizitätsprofil [52, 61, 62, 87, 97, 98, 99, 100, 101, 103]. In Phase-I/II-Studien wiesen lediglich 18 von insgesamt 160 Patienten eine Hämatotoxizität auf [78, 87, 97, 98, 99, 101]. Das Hauptaugenmerk wurde in vielen Studien auf Perifosin als Behandlungsoption beim MM gelegt [46, 55, 59, 68, 69, 90-95]. Wichtige präklinische *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zeigten, dass Perifosin bei den Zellen des MM Apoptose induzierte, ohne Toxizität auf PBMZ auszuüben [68]. Die Ergebnisse einer grundlegenden, am Mausmodell durchgeführten präklinischen Studie bekräftigten den Einsatz von Perifosin bei Myelompatienten. Es konnte gezeigt werden, dass Perifosin (1-20 μM) in mit Myelomzellen inokulierten Mäusen zu einer KM-Hyperplasie (gesteigerte Myelopoese) mit Leukozytose, Thrombozytose und milder Anämie führt. Zudem war das Wachstum der CFU-GM/myeloischen Progenitoren gesteigert, während in den Myelomzellen die Apoptose hervorgerufen wurde. Diese Erkenntnisse waren von großer klinischer Relevanz, da die Myelosuppression eine dosislimitierende Toxizität vieler zytotoxischer Wirkstoffe darstellt und eine myeloische Hyperplasie üblicherweise nur nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren erzielt werden kann [88]. Eine andere Studie belegte im Gegensatz dazu, dass Perifosin (2 μM) die Teilungsfähigkeit von AML-Zellen mindert, die Teilungsfähigkeit der gewöhnlichen CD34⁺-Zellen gesunder Spender und das CFU-Wachstum jedoch nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse bestätigten somit die in anderen Veröffentlichungen beschriebene geringe Hämatotoxizität. Eine Perifosin-Behandlung von AML-Zelllinien führte zur Apoptose und verringerte *in vitro* das Zellüberleben mit einer IC₅₀ von 2.7-15.8 μM . Das Überleben der Blasten von AML-Patienten reduzierte Perifosin bei *in vivo* Serumkonzentrationen mit einer IC₅₀ von 5.6-7.4 μM . Bemerkenswert war,

dass 2 μM Perifosin in Kombination mit Etoposid die Empfindlichkeit myeloischer Blasten gegenüber Etoposid deutlich erhöhte, aber dennoch unterhalb der *in vitro* IC_{50} -Zytotoxizität lag [67]. Da Perifosin bezüglich seiner Zytotoxizität gegenüber hämatopoetischen Progenitoren und Stammzellen unzureichend charakterisiert war, lag ein erstes Ziel dieser Arbeit darin, die Sensitivität von Perifosin und den gegen das MM gerichteten Wirkstoffen Lenalidomid, Bortezomib und Adriamycin gegenüber hämatopoetischen Progenitoren und Stammzellen zu beschreiben. Die Untersuchungen sollten Erkenntnisse über die Toxizität von Perifosin liefern und als Grundlage für den Einsatz von Perifosin als Einzelwirkstoff oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen bei MM-Patienten vor Stammzellapherese mit nachfolgender Hochdosistherapie dienen. Perifosin hemmte im klonogenen Agar-Assay konzentrationsabhängig das Gesamt-CFU-Wachstum (IC_{50} 37 μM) und die Bildung der verschiedenen CFU-Typen, wobei die Hemmung der CFU-GM am stärksten war und BFU-E nur zu einem geringen Anteil inhibiert wurde. Bei der CFU-Hemmung zeichneten sich aber keine deutlichen Unterschiede zwischen PB und KM HPZ ab. Eine Phase-I-Dosisfindungsstudie zeigte klinisch erreichbare Plasma-Perifosin-Konzentrationen von 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (16.2 μM) entsprechend einer MTD von 200 mg/d [61]. Eine andere Untersuchung etablierte eine maximal tolerierte Dosierung von 600 mg/Woche [62]. Weitere Dosisfindungsstudien, die eine „loading dose“ mit einer Erhaltungsdosis von 50 mg – 150 mg/d kombinierten, brachten ähnlich erreichbare Plasma-Perifosin-Konzentrationen bis maximal 8.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hervor [62, 87, 99, 158, 159]. Im Bereich der *in vivo* maximal erzielbaren Plasma-Perifosin-Konzentration von 16.2 μM zeigten die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten klonogenen Assays den CFU-hemmenden Effekt von Perifosin auf die Gesamt-CFU, CFU-GM und BFU-E mit etwa 20%, 30% und 15% sehr moderat. Demnach bestätigten die Ergebnisse der CFU-Untersuchungen, dass für Perifosin eher geringe Hämatotoxizitäten als Myelopoese-stimulierende Effekte charakteristisch sind. Somit weist Perifosin insgesamt ein günstiges hämatopoetisches Toxizitätsprofil auf. Dieser Aspekt deckt sich mit den klinischen Beobachtungen diverser vorangegangener und neuerer Studien [45, 48, 52, 61, 62, 82, 84, 87, 90, 91, 96, 99, 100, 106, 158]. Bei einigen Studien wurden vereinzelt Anämien sowie auch Grad 3 Thrombozytopenien/Neutropenien beobachtet [45, 48, 82, 91, 99, 106]. Die wenigen im Rahmen der Perifosingabe beschriebenen Anämien könnten durch einen kürzlich neu entdeckten Perifosineffekt, bei dem die Eryptose (Apoptose von Erythrozyten) angeregt wird, erklärt werden. Allerdings erfolgten die Untersuchungen mit den Erythrozyten gesunder Spender [160]. Perifosin induzierte in der vorliegenden Untersuchung bei menschlichen hämatopoetischen Vorläuferzellen im Gegensatz zu den Beobachtungen am

Mausmodell [88] eine Verminderung der klonogenen Aktivität - eine Erkenntnis, die mit dem Ergebnis einer vorangegangenen Arbeit korreliert [67].

Wie bei Perifosin sind von Bortezomib bezüglich der Versuchsreihen mit hämatopoetischen Progenitoren und Stammzellen nur wenige Daten verfügbar. In den vorliegenden Experimenten hemmte Bortezomib konzentrationsabhängig das Gesamt-CFU-Wachstum (IC_{50} 14 nM, IC_{90} 32 nM) und die verschiedenen CFU-Typen. Bei BFU-E (IC_{50} 14 nM, IC_{90} 30 nM) war die Wirkung etwas stärker als bei CFU-GM (IC_{50} 16 nM, IC_{90} 35 nM). Eine andere Arbeit zeigte, dass Bortezomib die CFU-GM gesunder Spender mit einer IC_{50} von 11.3 nM hemmte [161]. Bei einer weiteren Untersuchung inhibierte Bortezomib die PBMZ *in vitro* mit einer IC_{50} von 28 nM, außerdem ergab sich keine Hemmung von Neutrophilen gesunder Spender [162]. Im Rahmen verschiedener pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Studien beim rezidivierten Myelom konnte bei Bortezomibinfusionen von 1.0 und 1.3 mg/m² entsprechend der Dosierung in der klinischen Routine eine *in vivo* Plasmakonzentration von etwa 55-120 ng/mL, entsprechend 143-312 nM, bestimmt werden [163]. Vergleicht man die in dieser Arbeit erreichten mittleren IC_{50} - und IC_{90} -Werte mit der maximal erreichbaren Plasmakonzentration (C_{max}), so liegen diese IC -Werte deutlich unter der *in vivo* typischerweise erreichten Plasmakonzentration. Da aber die C_{max} direkt nach der intravenösen Bortezomibinfusion erreicht wird, nach einer Stunde im Plasma unerhebliche Präparatmengen vorliegen und die 20S Proteasomenhemmung bereits ab Konzentrationen von >5 ng/mL, entsprechend >13 nM, mit etwa 70% bis 84% in Zusammenhang mit der Toxizität von Bortezomib einen Maximaleffekt zeigt [163, 164], scheint sich die erwähnte Abweichung zu nivellieren. Dementsprechend korrespondieren die ermittelten IC -Werte von Bortezomib mit einer erhöhten Suppression der Blutbildung und bestätigen somit sein Hämatotoxizitätsprofil, das sich bei dessen Einsatz beim rezidivierenden MM mit etwa 40% Thrombozytopenien, 21% Anämien und 19% Neutropenien zeigte [164]. Weitere Phase-II/III-Studien (SUMMIT, CREST, APEX), welche die Wirksamkeit von Bortezomib beim RRMM bestätigten und zu dessen Zulassung führten, zeigten ein ähnliches Hämatotoxizitätsprofil [165]. Wie Perifosin und Bortezomib, so hemmte Lenalidomid ebenfalls das CFU-Wachstum. Lenalidomid bewegte sich bezüglich der C_{max} in einem Bereich von etwa 390 ng/ml, entsprechend 1.5 μ M (20-40jährige Patienten) und etwa 568 ng/ml, entsprechend 2.2 μ M (ältere Patienten) [166]. Anhand der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse befindet sich die CFU-Hemmung durch Lenalidomid im Rahmen der C_{max} von Lenalidomid. Bei genauerer Betrachtung der CFU-Untertypen ließ sich feststellen, dass BFU-E durch Lenalidomid am stärksten gehemmt wurde, gefolgt von CFU-GEMM und CFU-GM. Jedoch wurde selbst bei hohen Lenalidomidkonzentrationen bis 10 μ M die IC_{50} bei CFU-GM nicht erreicht. Diese

Beobachtungen spiegelten sich folglich auch in einem erhöhten Verhältnis der CFU-GM und BFU-E Gesamtzahl wider. Bei einer mikromolaren Lenalidomidkonzentration (1 μ M) zeigte sich in der vorliegenden Arbeit ein signifikant ($p < 0.05$) erhöhtes Verhältnis der Absolutzahlen zwischen CFU-GM- und BFU-E- Kolonien im Vergleich zur Negativkontrolle. In einer anderen Arbeit zeigte sich, dass bei niedrigen nanomolaren Lenalidomidkonzentrationen (1 nM) das Verhältnis der myeloischen (CFU-GM) und erythroiden (BFU-E) Kolonien erhöht war und sich mit steigenden Lenalidomidkonzentrationen bis 10 nM verkleinerte, ohne dass die Gesamtanzahl der Kolonien beeinflusst wurde [167]. Somit lässt das vorliegende Ergebnis schlussfolgern, dass bei steigenden Konzentrationen von einer verstärkten Hemmung der BFU-E zugunsten von CFU-GM auszugehen ist. Es wurde angenommen, dass die Lenalidomidwirkung auf die Erythropoese konzentrationsabhängig ist [167] - ein Aspekt, der auch durch die in dieser Arbeit ermittelten Daten für Lenalidomid gestützt wird, da BFU-E vermehrt gehemmt wurde. Eine weitere Arbeit bestätigte ebenfalls die Lenalidomidwirkung auf die Erythropoese. Es wurde *in vitro* gezeigt, dass Lenalidomid in Kombination mit Dexamethason und als Einzelsubstanz zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Gesamtzahl erythroider Zellen, der normalen CD34⁺-Progenitoren und der CD34⁺-Progenitoren von MDS-Patienten führt. Es wurde überdies belegt, dass Lenalidomid insbesondere die CFU-E Kolonienbildung selektiv induzierte und BFU-E / CFU-GM-Kolonien nicht beeinflusste. Die BFU-E Stimulation erfolgte hierbei hauptsächlich durch Dexamethason [168]. Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit und weiterer Studien bestätigten, dass CFU-GM durch Lenalidomid kaum bis gar nicht gehemmt wurde. Als Immunmodulator hemmt Lenalidomid die myeloische Reifung, der Mechanismus ist jedoch bis heute nicht gänzlich geklärt. Dies könnte darlegen, warum sich weder in dieser noch in anderen Studien eine signifikante Wirkung von Lenalidomid auf die CFU-GM zeigte, obwohl gerade Neutropenie eine der Hauptnebenwirkungen von Lenalidomid ist [169]. Gegenwärtige Daten scheinen eine Erklärung für die Hemmung der myeloischen Reifung und Neutropenie gefunden zu haben. Lenalidomid reguliert die Transkriptionsfaktoren Ikaros (IKZF1) und PU.1 in CD34⁺-Progenitoren, die für die myeloische Reifung wichtig sind. Eine selektive Herunterregulierung von Ikaros durch Lenalidomid führt zur Herunterregulierung von PU.1 und zur Verminderung der Ausreifung myeloischer Zellen mit folglich Neutropenie. Diese Erkenntnisse über den Einfluss der IMiD auf die Hämatopoese könnten zu neuen therapeutischen Ansätzen führen [170, 171].

Lenalidomid ist bei der Behandlung des MM, des Mantelzelllymphoms, der CLL und des MDS mit 5q-Deletion effektiv, aber eine bedeutende Nebenwirkung bleibt seine Hämatotoxizität [124, 125, 172, 173]. Beim neu diagnostizierten MM hat die Therapie mit Lenalidomid in

Kombination mit Dexamethason eine signifikante Zunahme von Thrombozytopenie, Neutropenie und Anämie zur Folge. Die Effekte bei alleiniger Dexamethasongabe sind geringer ausgeprägt [125, 171, 174]. Eine Therapie mit Lenalidomid von Patienten mit Niedrig-Risiko-MDS und 5q-Deletion führt bei etwa 50% der Patienten zu Beginn der Therapie zu signifikanten Zytopenien. Dabei ist die Rate der Unabhängigkeit von Bluttransfusionen bei Patienten höher, die ausgeprägte behandlungsbezogene Thrombozytopenien entwickeln. Bei Niedrig-Risiko-MDS Patienten ohne 5q-Deletion konnte dies nicht beobachtet werden [174]. Eine andere Arbeit untersuchte den Einfluss von Lenalidomid auf KM HPZ von MDS Patienten mit 5q-Deletion vor und nach Therapiebeginn. Hierbei wurde festgestellt, dass Lenalidomid den Anteil der CD34⁺-Zellen verringerte und das klonogene Potential von erythroiden, myeloischen und megakaryozytischen koloniebildenden Zellen signifikant steigerte [172]. Da Lenalidomid bei gesunden Spendern insgesamt das CFU-Wachstum und das klonogene Potential koloniebildender Zellen kaum beeinflusste, verdeutlichen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass Lenalidomid grundsätzlich verschiedene Wirkungen auf das klonogene Potential der Progenitorzellen von Patienten mit MDS und von gesunden Spendern haben könnte, so wie es auch eine weitere Studie darlegte [168].

Bei Adriamycin bewegt sich die C_{max} innerhalb der ersten 10 Min. nach Infusion bei 500-1.500 ng/ml (entsprechen etwa 0.5-1.5 µM) [175]. Adriamycin hemmte die verschiedenen CFU-Typen (IC₅₀ von CFU-Gesamt 4.4 µM, IC₅₀ von CFU-GM 10.3 µM) im Vergleich zur C_{max} nur moderat. Dieses Ergebnis stimmt mit der Tatsache überein, dass eine Hämatotoxizität bei etwa 30-50% der Patienten auftrat, die mit Adriamycin als Einzelsubstanz behandelt wurden, wobei die Hämatotoxizität in Kombination mit anderen Wirkstoffen höher war [129]. Es ist für zukünftige Wirkstoffuntersuchungen denkbar, zusätzlich zum klassischen IC₅₀-Wert klinisch relevantere höhere Effekt-Werte wie IC₇₀ oder IC₉₀ für die Vorhersage möglicher hämatologischer Toxizität heranzuziehen. Beispielsweise bewirkt eine Grad 3 Neutropenie eine ca. 75%ige Minderung der Neutrophilenzahl im peripheren Blut und eine Grad 4 Neutropenie, die als dosislimitierende Toxizität gilt, eine ca. 90%ige Minderung [162]. Die CFU-Kombinationsversuche zeigten, dass Perifosin zusammen mit Lenalidomid oder Adriamycin dazu neigte, die CFU-Bildung antagonistisch zu hemmen. Da ein Antagonismus zweier Wirkstoffe bedeutet, dass der Effekt der Kombination weniger ausgeprägt ist als die Summe der Effekte der Einzelsubstanzen, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass diese Kombinationen bei der Behandlung ein günstiges hämatologisches Nebenwirkungsprofil aufweisen. Eine Phase-I/II-Studie (Perifosin plus Lenalidomid und Dexamethason) beim RRMM zeigte eine hämatologisch akzeptable Verträglichkeit bei klinischer Wirksamkeit dieses Regimes. Jedoch erfolgten bisher

keine weiteren Vergleichsstudien, obwohl die Wirksamkeit dieses Behandlungsschemas sehr vielversprechend war. 73% der Studienpatienten hatten eine minimale Remission oder besser. Das progressionsfreie Überleben lag bei 11 Monaten und das Gesamtüberleben bei 31 Monaten [90].

Insgesamt betrachtet konnten die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Wirkstoffe bezüglich ihrer Wirkung gegenüber HPZ weiter charakterisiert werden. Die Ergebnisse bestätigen, dass im Gegensatz zu ihren Myelopoese-stimulierenden Effekten bei Mausmodellen sowohl Perifosin als auch Bortezomib und Lenalidomid das klonogene Potential der HPZ gesunder Spender *in vitro* unterdrücken. Alle in dieser Arbeit eingesetzten Wirkstoffe hemmten konzentrationsabhängig bei klinisch erreichbaren Plasmakonzentrationen die CFU-Bildung in den klonogenen Versuchsansätzen (leichte bis moderate Unterdrückung des klonogenen Potentials mit leichter bis moderater Zytotoxizität gegenüber den normalen HPZ). Dementsprechend zeigten die Wirkstoffe bei CD34⁺-selektierten PB HPZ in Versuchsansätzen mit Durchflusszytometrie-basierter Caspase- und Annexin-V-Proben, Trypanblaumessungen und immunhistochemischen Untersuchungen ebenfalls leichte bis moderate Zytotoxizität. Die Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die Hämatotoxizität beherrschbar ist und dass Perifosin in Kombination mit den untersuchten Wirkstoffen die Gewinnung von funktionsfähigen HPZ zur Hochdosistherapie mit autologer SZT nicht beeinflusst. Mehrere klinische Studien belegen, dass Stammzellen nach der Behandlung mit Bortezomib oder Lenalidomid erfolgreich gewonnen werden können. Perifosin konnte in diesem Setting bisher jedoch nicht zugelassen werden. Zum einen zeigen die gegen das MM gerichteten Wirkstoffe Bortezomib, Lenalidomid, Cyclophosphamid und Dexamethason in verschiedenen Kombinationen und Sequenzen und neuere Wirkstoffe wie Carfilzomib, Ixazomib, Elotuzumab oder Daratumumab erfolversprechendere Ansätze als Perifosin. Zum anderen hat Perifosin, obwohl es in vielen Phase-I/II-Studien als Einzelsubstanz und vor allem in Kombination mit anderen Wirkstoffen Ergebnisse mit gewisser Wirksamkeit aufwies, in der Behandlung hämatologischer Erkrankungen an Bedeutung verloren [53, 54, 55, 95, 176, 177].

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag darin, an den von Zelllinien hämatologisch-maligner Erkrankungen stammenden Zellen weitere Einblicke in die zellulären Mechanismen, die mit der Zytotoxizität von Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid in Zusammenhang stehen, zu gewinnen und Kombinationseffekte von Perifosin und Bortezomib zu untersuchen. Perifosin und Bortezomib zeigten anhand von Trypanblau- und Durchflusszytometrieuntersuchungen als Einzelwirkstoffe bei den untersuchten Zelllinien eine konzentrations- und zeitabhängige Zytotoxizität. Lenalidomid dagegen wirkte bei Konzentrationen von bis zu 10 µM, welche die

C_{max} von etwa 568 ng/mL (2.2 µM) [166] deutlich übersteigen, eher marginal. Dieser Aspekt deutet durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit möglicherweise darauf hin, dass Perifosin und Bortezomib *in vivo* neben anderen Mechanismen eher durch die Einleitung der Apoptose aktiv waren. Die antimaligen Effekte von Lenalidomid dagegen werden weniger durch direkte Wirkung auf maligne Zellen, sondern eher durch Mechanismen im Rahmen der Immunmodulation vermittelt [124, 125]. Andere Studien gaben ähnliche Beobachtungen von Lenalidomid bei Myelomzelllinien an [178]. In einigen Untersuchungen zeigte Lenalidomid, dass es als Einzelwirkstoff die Apoptose einleitet. Dennoch wurde bisher kontrovers diskutiert, welche zellulären Prozesse des komplexen Wirkmechanismus von Lenalidomid genau gesteuert werden [124, 179, 180]. Obgleich die Effekte von Lenalidomid vielfältig sind, haben neuere molekulare Erkenntnisse ergeben, dass die antineoplastische Wirkung von Lenalidomid ihren Ursprung im Abbau der zwei lymphoiden Transkriptionsfaktoren Ikaros (IKZF1) und Aiolos (IKZF3) hat, und dass das KM-Mikromilieu hierbei eine Rolle spielen könnte [171, 173, 181]. Bei den Zelllinien U266 (MM) und DOHH-2 (Non-Hodgkin-Lymphom) zeigte Bortezomib in der Durchflusszytometrie (Caspaseassay) nach 24 Std. Inkubation IC₅₀-Werte von 12.0 und 11.4 nM und nach 48 Std. von 2.1 und 4.4 nM. Diese Werte liegen im Bereich der klinisch erreichbaren Plasma-Bortezomib-Konzentrationen von etwa 55-120 ng/mL (143-313 nM) [161, 163]. Bei der Zelllinie K562 (CML) lag die IC₅₀ nach 24 Std. Inkubation über 20 nM und wies im Vergleich zu den anderen Zelllinien die niedrigste Bortezomibempfindlichkeit auf. Dieses Ergebnis stimmt auch mit anderen Daten, die bei der Zelllinie K562 eine IC₅₀ von 2.500 nM ermittelten (unter Einsatz eines WST-1 wasserlöslichen Tetrazoliumsalz-1 Assay), überein [161]. Bei HL-60 (AML) Zellen ergaben sich IC₅₀-Werte von 10.4 nM nach 24 Std. Inkubation. Allerdings konnte Bortezomib in der Immunhistochemie den prozentualen Anteil an Ki-67⁺ HL-60 Zellen nicht signifikant senken. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich trotz Apoptoseinduktion noch ein wesentlicher Anteil der Zellen in der aktiven G₁-, S-, G₂- und M-Phase des Zellzyklus befindet. Diese Beobachtung könnte gegen den alleinigen Einsatz von Bortezomib sprechen. Bei klinisch erreichbaren Plasmakonzentrationen (etwa 7.5 µg/mL, 16.2 µM) [61] zeigte Perifosin mit IC₅₀-Werten von über 20 µM im Vergleich zu Bortezomib in den durchgeführten Caspaseassays als Einzelsubstanz nur geringe Effekte gegenüber verschiedenen Zelllinien. Von den untersuchten Zelllinien (U266, KMH-2, DOHH-2) wurde die Apoptose in der DOHH-2 Linie ebenfalls moderat, aber stärker als bei den anderen Zelllinien, induziert. Diese verhältnismäßig geringen Wirkungen von Perifosin, die im Rahmen der Durchflusszytometrie- (Caspaseassays) und Trypanblauuntersuchungen ermittelt wurden, konnten auch durch Annexin-V-Proben und immunhistochemische Untersuchungen (Anti-

Caspase-3 und Anti-Ki-67-Antikörper) bestätigt werden. Eine grundlegende Arbeit mit *in vitro* und *in vivo* Mausmodell-Versuchen an Myelomzellen von MM-Patienten und MM-Zelllinien (unter anderem mit RPMI8226- und U266-Zelllinien) zeigte niedrigere IC₅₀-Werte von 1.5-15 µM [68]. Bei Zelllinien akuter T-Zell-Leukämie waren die für Perifosin ermittelten IC₅₀-Werte mit 6.8-19.3 µM ebenfalls niedriger [66]. Allerdings wurde die Zytotoxizität in diesen Studien mittels MTT-Assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetranatriumbromid) ermittelt. Im Unterschied dazu erfolgten die Untersuchungen zur Zytotoxizität in dieser Arbeit mit mehreren verschiedenen Methoden (Immunhistochemie, Durchflusszytometrie (Caspase und Annexin-V) und Trypanblau). Eine weitere Arbeit legte dar, dass Perifosin nach 48 Std. bei HL-60 Zellen eine IC₅₀ von 4.24 µM aufwies und sich CML-Zellen (K562) Perifosin gegenüber resistent zeigten, was bezüglich K562 mit den Daten dieser Arbeit (IC₅₀ >40 µM) weitestgehend korreliert. Das könnte bedeuten, dass APL bei CML durch Hochregulierung des Autophagie-Proteins ATG5 eher Autophagie hervorrufen als Apoptose, bei AML umgekehrt, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte [79]. Der Vergleich der IC₅₀-Werte der vorliegenden Arbeit mit bisher publizierten IC₅₀-Werten führt zu der Annahme, dass Perifosin eher höhere IC₅₀-Werte benötigt, um antitumorale Effekte zu erzielen und sich somit eher als Kombinationspartner eignet, als für den Einsatz als Einzelsubstanz, was auch die klinische Datenlage teils zum Ausdruck brachte [66, 81, 82, 86]. Beispielsweise sensibilisierte Perifosin im Rahmen synergistischer zytotoxischer Effekte resistente AML-Zellen für den vom SNS-032 getriggerten Zelltod. Durch die Perifosinsensibilisierung konnte die IC₅₀ von SNS-032 von >300 nM auf 80 nM gesenkt werden. Zudem hemmte diese Kombination das klonogene Potential leukämischer Zellen [80]. Auf Basis der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist es möglich, dass die Zellkulturbedingungen und die experimentellen Rahmenbedingungen auch einen Einfluss auf die Empfindlichkeit von Perifosin haben könnten. Beispielsweise könnten unterschiedliche Konzentrationen der Zell-Medium-Additive wie z.B. FKS unwägbare Schwankungen der Zell-Wirkstoff-Medium-Suspension hervorrufen. Dementsprechend könnten sie, wie auch in einer Arbeit publiziert [47], insbesondere bei niedrigeren Konzentrationen zum Teil für die hier ermittelten moderaten Wirkungen von Perifosin verantwortlich sein. Weiterhin lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten, dass die IC₅₀-Werte je nachdem, welche Zelllinie verwendet wurde, relativ stark variieren könnten oder Abweichungen auch mit der Inkubationszeit in Zusammenhang stehen könnten, da sich bei kürzeren Zeiten, z.B. 24 Std. im Vergleich zu 48 Std., die IC₅₀ hin zu höheren Werten bzw. niedrigerer zytotoxischer und antiproliferativer Wirkung verschiebt. Des Weiteren könnten die in der vorliegenden Arbeit ermittelten IC₅₀-Werte für Perifosin neben den erwähnten experimentellen Gründen oberhalb der

zitierten Perifosin-Plasmakonzentrationen liegen, da die Konzentrationen von Perifosin im Tumorgewebe deutlich höher sein können. Pharmakokinetische Untersuchungen an Mausmodellen legten nahe, dass Perifosinkonzentrationen in Tumorzellen mit Werten von 60-100 µg/g entsprechend 130-216 µM/kg höher sind als im Plasma. Dieser Aspekt deutet darauf hin, dass *in vivo* eine höhere Perifosinkonzentration im Tumorgewebe vorliegt und dies auch mit der Apoptoseinduktion korreliert [60, 75]. Perifosin mit Bortezomib kombiniert zeigte in einer Phase-I/II-Studie beim MM vielversprechende Ergebnisse [91, 94]. Eine präklinische Studie ergab, dass Perifosin (2.5 und 5 µM) die Zytotoxizität von Bortezomib (5 und 7.5 nM) gegenüber MM-Zellen (MM.1S Zelllinie) [68] triggerte, sodass auch die Wirkstoffkombination Perifosin/Bortezomib bei anderen Zelllinien untersucht wurde. Simulierte Kombinationseffekte bei KMH-2 Zellen ergaben nach 24 Std. Inkubation einen additiven oder synergistischen Effekt von 25% gegenüber 30% nach 48 Std. Inkubation. Der geringfügige Unterschied zwischen der 24 und 48 Std. Inkubation könnte darauf schließen lassen, dass beide Wirkstoffe in diesem Bereich leicht antagonistisch agieren. Bei HL-60 Zellen zeigte sich ein CI von deutlich <1. Der kombinierte Effekt lag zwischen 25% und 75%, was einem leichten bis starken Synergismus entspricht. Diese Ergebnisse und auch die Beobachtungen der Einzelwirkungen von Perifosin und Bortezomib auf verschiedene Zelllinien verdeutlichten, dass Perifosin und Bortezomib *in vitro* vorwiegend additiv oder synergistisch wirken, allerdings bei verschiedenen Zelllinien ein leichter Antagonismus bei niedrigen Wirkstoffkonzentrationen grundsätzlich möglich wäre. Die Durchflusszytometrie stellt in der Klinikroutine einen Goldstandard in der Diagnostik von malignen Zellen dar. In der Hämatologie werden spezielle Fluoreszenz-Durchflusszytometrie-Geräte, wie der XE-5000 Case Manager (ACAS-Verfahren), in der Routinediagnostik eingesetzt. Der Vorteil besteht darin, dass Proben nicht speziell aufbereitet werden müssen. Untersuchungen an malignen Zelllinien waren zum Zeitpunkt der durchgeführten Versuche mit diesem Gerät nicht umfassend erfolgt. Daher lag ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, herauszufinden, ob mit dem IMI-Kanal des XE-5000, der ursprünglich entwickelt wurde, um sowohl unreife myeloische Zellen als auch PB HPZ nachzuweisen, ein Verfahren etabliert werden könnte, zytotoxische Zellprozesse zu ermitteln. Die Erfassung von IMI-Zellen basiert auf der zellulären Fettzusammensetzung. Mit der IMI-Technik können auch Formveränderungen, wie z.B. Membranausstülpungen von Neutrophilen, nachgewiesen werden [152]. APL wie Perifosin führen zu einer deutlichen Veränderung der Homöostase von Phospholipiden, beeinträchtigen den zellulären Fettstoffwechsel, wirken durch die Interaktion mit der Plasmamembran und durch die Bildung von Lipid Rafts. Zudem wurde belegt, dass diese Prozesse von einer größeren morphologischen Formveränderung begleitet werden. Dieser Zusammenhang begründete die

Versuche mit der IMI-Technik [55, 59]. Die Ergebnisse der Messungen im IMI-Kanal demonstrierten, dass nur Perifosin aufgrund seiner spezifischen APL-Eigenschaft, konzentrationsabhängig im Bereich von 10 und 20 μM zu einer signifikanten Erhöhung des prozentualen Anteils der IMI⁺-Kulturzellen führte, während das weder bei Bortezomib noch bei Lenalidomid der Fall war. Dennoch variierte der prozentuale Anteil der von Perifosin induzierten IMI⁺-Zellen bei separater Betrachtung der verschiedenen Zelllinien. Perifosin erhöhte den prozentualen Anteil der IMI⁺-HL-60 Zellen signifikant. Auch bei den anderen eingesetzten Zelllinien war unter Perifosin der Anteil der IMI⁺-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle tendenziell erhöht. Die Myelomzelllinien zeigten bei der DOHH-2 Linie den stärksten Anstieg der IMI⁺-Zellen und wiesen somit in Übereinstimmung mit den Apoptoseassays die ausgeprägtesten Effekte auf. Diese Beobachtung ist gut damit vereinbar, dass nur Perifosin möglicherweise sowohl über Caspasen als auch über die als „Lipid Rafts“ beschriebenen membranösen Einschlüsse durch Akkumulation von Todesrezeptoren die Apoptose induziert. Diese zellulären Stoffwechselfvorgänge können die Veränderungen im IMI-Kanal gut erklären, da auch membranöse Veränderungen bei Neutrophilen als Ausdruck von Veränderungen im IMI-Kanal beschrieben wurden [59, 152]. Auch bei Konzentrationen, welche nur eine geringe Apoptoseinduktion bewirken, steigerte Perifosin die Anzahl unlyserter Kulturzellen. Somit könnte der XE-5000 (IMI-Methode) als ein zusätzlich potentiell zeit- und kostenrentables Analysegerät zur Bestimmung zytotoxischer Zellprozesse bei bestimmten Wirkstoffen fungieren. Dennoch sind weitere Untersuchungen nötig, um die hier abgeleiteten Erkenntnisse zu bestätigen und um eventuell auch über die APL hinaus andere Wirkstoffe zu testen.

Zusammenfassend veranschaulichen die Ergebnisse, dass vorrangig Perifosin und Bortezomib und nachrangig Lenalidomid die Zytotoxizität bei den verschiedenen, hämatologisch-malignen Erkrankungen entstammenden Zellkulturen durch Caspaseaktivierung einleiteten. Perifosin und Bortezomib zeigten in den *in vitro* Versuchen additive oder synergistische Effekte. Daher konnte anhand dieser Arbeit die Annahme, dass der klinische Nutzen beider Wirkstoffe in Kombination den Erfolg der Einzelwirkstoffbehandlung bei Patienten mit hämatologisch-malignen Erkrankungen, insbesondere dem MM übertrifft, bestätigt werden. Perifosin gehört zu den in klinischen Studien am besten untersuchten APL. Den vielversprechenden Effekten, die Perifosin im Rahmen der Grundlagenforschung im Labor und bei präklinischen Studien zeigte, stehen schlussendlich negative Ergebnisse von zwei Phase-III-Studien (Kolonkarzinom, MM) mit der Konsequenz gegenüber, dass weitere Perifosinstudien eingestellt wurden und somit den Enthusiasmus um Perifosin beendeten [95, 104]. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ließ sich ableiten, dass die Perifosin-Bortezomib-Kombination mit günstigem Toxizitätsprofil eine

Therapiealternative für das MM hätte darstellen können. Erfolge zeigten dementsprechende Phase-I/II-Studien beim RRMM [90, 91]. Jedoch kam man zu der Erkenntnis, dass die Kombination in der Phase-III-Studie keine Aussicht auf Vorteile beim progressionsfreien Überleben ergab, sodass sie abgebrochen wurde [95]. In den Kombinationsversuchen zeigten Perifosin und Bortezomib bei unterschiedlichen Zelllinien additive bis leicht synergistische Effekte, allerdings auch eine leichte Tendenz zum Antagonismus. Eventuell könnte dieser Aspekt ein gewisser Hinweis für das Versagen in der Phase-III-Studie sein. Und auch, obwohl Perifosin bei den hier durchgeführten *in vitro* Versuchen zur AML-Zelllinie HL-60 Apoptoseeffekte zeigte, kam Perifosin im Rahmen der AML als Kombinationspartner nicht über die Phase-II-Studien hinaus. In den letzten Jahren wurde Perifosin in hämatologischen Studien zum Hodgkin Lymphom (in Kombination mit Sorafenib), zur ALL und CLL mit teilweise positiven Ergebnissen untersucht [80, 81, 82, 84]. Die Evaluierung wurde jedoch auch hier nicht weiter verfolgt, sodass Perifosin insgesamt gesehen als ein erfolgreicher Wirkstoff im Rahmen der Grundlagenforschung angesehen werden könnte. Im Bereich der soliden Malignome erfolgten in jüngster Vergangenheit Phase-I/II-Studien mit dem NSCLC in Kombination mit Paclitaxel [113] und dem Bcl-2 Antagonisten ABT-737 [114], welche synergistische Apoptoseeffekte zeigten. Bei rezidivierenden pädiatrischen ZNS-Tumoren und Neuroblastomen als Monotherapie [48, 106] und bei pontinen Gliomen in Kombination mit dem Mek-Inhibitor Trametinib [117] konnte Perifosin erfolgversprechende Ergebnisse erzielen, sodass womöglich zumindest auf diesem Gebiet weitere Phase-II-Studien gestartet werden könnten. Nach Recherche der Datenbank von clinicaltrials.gov (<https://clinicaltrials.gov>, letzter Zugriff am 17.05.2019) sind zum aktuellen Zeitpunkt nur noch zwei Studien mit Perifosin aktiv: eine Phase-I-Kombinationsstudie mit Perifosin und Temsirolimus im Rahmen des rezidivierten malignen Glioms und eine Phase-II-Studie mit alleinigem Perifosin bei rezidiviertem/progressivem malignem Gliom [53]. Bei der Behandlung des MM gehören z.B. Bortezomib und Lenalidomid zum etablierten Goldstandard. Außerdem haben neue Wirkstoffe wie Pomalidomid, Carfilzomib, Elotuzumab, Ixazomib und Daratumumab [177, 182, 183] als Einzelsubstanzen oder Kombinationspartner die Myelombehandlung verbessert. Der Akt-Signalweg ist bei Malignomen der am häufigsten dysregulierte Signalweg und spielt z.B. bei der Pathogenese des MM auf der Ebene des KM-Mikromilieus eine bedeutende Rolle. Insbesondere ist der Einfluss auf nachgeschaltete Steuerungsmoleküle und in diesem Zusammenhang auch auf wichtige Transkriptionsfaktoren (z.B. Foxo) bei der Tumorgenese bedeutend [53, 54]. Im Falle des MM zielen neue Therapien auf eine Beeinflussung des Tumors im KM-Mikromilieu hin, welche in Kombination mit autologer SZT bessere Therapieergebnisse in Aussicht stellt [123]. Die

genannten Aspekte lassen erahnen, dass einem Wirkstoff wie Perifosin hier Grenzen gesetzt sein könnten. Da sich leukämische Krebsstammzellen vorwiegend im KM-Mikromilieu ansiedeln, kann dies ein weiterer Grund für die klinisch begrenzte Wirksamkeit von Perifosin sein. Signalwege wie Notch, Wnt und Hedgehog oder PTEN spielen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung und Selbsterneuerung leukämischer Stammzellen, sodass eine zielgerichtete Kombination selektiver Akt-Inhibitoren mit Wirkstoffen, die die genannten Signalwege beeinflussen, effektiver sein könnte [184, 185]. Die Akt-Targeting-Strategie stellt eine pharmakologische und mannigfaltige Herausforderung dar, wie anhand von Perifosin in der vorliegenden Arbeit verdeutlicht werden konnte. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt hat keine Phase-III-Studie mit einem Akt-Inhibitor als Einzelsubstanz überzeugen können, obgleich es zahlreiche neue vielversprechende Akt-Inhibitoren gibt [51, 53]. Demgegenüber deuten neuere selektive allosterische Akt-Inhibitoren wie z.B. TAS-117 oder ATP (Adenosintriphosphat)-kompetitive Inhibitoren wie Afuresertib Vorteile gegenüber Perifosin an, da sie die Zytotoxizität gegenüber Myelomzellen stärker triggern und im Bereich des KM-Mikromilieus effektiver erscheinen. Vor allem könnten diese in Kombination mit neueren Proteasomeninhibitoren wie Carfilzomib noch effektiver wirken [46, 51, 186, 187]. Es scheint, als ob Krebsstammzellen im KM-Mikromilieu und genetische Veränderungen/Mutationen, wie sie auch bei Akt-Signalweg-Anomalien u.a. in Form des PTEN-Verlustes und in Form von Akt-Mutationen vorkommen, ein Schlüsselthema für die mögliche Ineffektivität der Akt-Inhibitorwirkung sind. Weitere Therapie- bzw. Eingriffsmöglichkeiten müssen erst gefunden werden. Beispielsweise erfolgt durch eine große, mehrarmige klinische Studie, der „NCI Molecular Analysis of Therapy Choice (NCI MATCH)“, die Analyse der gezielten Therapie bekannter genetischer Veränderungen. Demnach wurde gegenwärtig ein Arm für Akt-Inhibitoren, die ähnlich wie Perifosin im präklinischen Setting Antitumoreffekte zeigten und in klinischen Studien keine weiteren Ergebnisse erzielen konnten, bei Tumorpatienten mit identifizierten zugrundeliegenden Akt-Mutationen nach einer Akt-Behandlung aktiviert. Spezifische Studien wie MATCH könnten Klarheit verschaffen, ob Akt-Inhibitoren zukünftig bei selektiven Patientengruppen Erfolg haben könnten [53, 188]. Aktuell bleibt abzuwarten, ob sich neuere Akt-Inhibitoren, die sich in klinischen Phase-II-Studien befinden, als Einzelsubstanz bei selektiven Entitäten und Patientengruppen im Rahmen einer „personalisierten“ Behandlung durchsetzen können oder doch eher als Kombinationstherapie mit anderen Wirkstoffen oder Akt-Inhibitoren eingesetzt werden sollten.

6. Literaturverzeichnis

1. Ramalho-Santos M., Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell*. 2007 Jun 7; 1(1): 35-8.
2. Till James E., McCulloch Ernest A., Siminovitch Louis. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1964 Jan; 51: 29-36.
3. Becker A.J., McCulloch E.A., Till J. E. Pillars article: Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963. 197: 452-454. *J. Immunol*. 2014 Jun 1; 192(11): 4945-7.
4. Till James E., McCulloch Ernest A. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research* Vol.14, No. 2 (Feb. 1961), pp. 213-222.
5. Daley G. Q., Goodell M. A., Snyder E. Y. Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003: 398-418.
6. Anna Porwit Jeffrey McCullough Wendy Erber. *Blood and Bone Marrow Pathology*. 2nd Revised edition. London, United Kingdom: Elsevier Health Sciences, 2011: 19-44.
7. Jagannathan-Bogdan M., Zon L. I. Hematopoiesis. *Development*. 2013 Jun; 140(12): 2463-7.
8. Olofsson TB. Growth regulation of hematopoietic cells. An overview. *Acta Oncol*. 1991; 30(8): 889-902.
9. Faramarz Naeim, P. Nagesh Rao, Sophie X. Song, Wayne W. Grody. *Atlas of Hematopathology: Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches*. 1st Edition. London: Academic Press, 2013: 1-24.
10. Bellantuono I. Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr; 36(4): 607-20.
11. Gerard J. Graham and Eric G. Wright. Haemopoietic stem cells: their heterogeneity and regulation. *Int J Exp Pathol*. 1997 Aug; 78(4): 197–218.
12. Spangrude G. J., Heimfeld S., Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988 Jul 1; 241(4861): 58-62.
13. Connie J. Eaves. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality *Blood*. 2015 Apr 23; 125(17): 2605–2613. Prepublished online 2015 Mar 11.
14. Morrison S. J., Shah N. M., Anderson D. J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997 Feb 7; 88(3): 287-98.
15. Lajtha L. G. Stem cell concepts. *Differentiation*. 1979; 14(1-2): 23-34.

16. Weissman I. L., Anderson D. J., Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; 17: 387-403.
17. Gordon M. Y. Human haemopoietic stem cell assays. *Blood Rev.* 1993 Sep; 7(3): 190-7.
18. Faris Q. Alenzi, Badi Q. Alenazi, Shamweel Y. Ahmad, Mohamed L. Salem, Ali A. Al-Jabri, and Richard K.H. Wysee. The Haemopoietic Stem Cell: Between Apoptosis and Self Renewal. *Yale J. Biol Med.* 2009 Mar; 82(1): 7–18.
19. Boulais P. E., Frenette P. S. Blood. Making sense of hematopoietic stem cell niches. 2015 Apr 23; 125(17): 2621-9.
20. Calvi L. M., Link D. C. The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. *Blood.* 2015 Nov 26; 126(22): 2443-51.
21. Asada N., Takeishi S., Frenette P. S. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Int J Hematol.* 2017 Jul; 106(1):45-54.
22. Edwards R. G. Stem cells today: B1. Bone marrow stem cells. *Reprod Biomed Online.* 2004 Nov; 9(5): 541-83.
23. Miyamoto K., Araki K. Y., Naka K., Arai F., Takubo K., Yamazaki S., Matsuoka S., Miyamoto T., Ito K., Ohmura M., Chen C., Hosokawa K., Nakauchi H., Nakayama K., Nakayama K. I., Harada M., Motoyama N., Suda T., Hirao A. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell.* 2007 Jun 7; 1(1): 101-12.
24. Goyama S., Wunderlich M., Mulloy J. C. Xenograft models for normal and malignant stem cells. *Blood.* 2015 Apr 23; 125(17): 2630-40.
25. Carroll D., St. Clair D. K. Hematopoietic Stem Cells: Normal Versus Malignant. *Antioxid Redox Signal.* 2017 Dec 20.
26. Civin C. I., Strauss L. C., Brovall C., Fackler M. J., Schwartz J. F., Shaper J. H. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984 Jul; 133(1): 157-65.
27. Faramarz Naeim, P. Nagesh Rao, Sophie X. Song, Wayne W. Grody. Atlas of Hematopathology: Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches. 1st Edition. London: Academic Press, 2013: 26-46.
28. Remberger M., Törlén J., Ringdén O., Engström M., Watz E., Uhlin M., Mattsson J. Effect of Total Nucleated and CD34⁽⁺⁾ Cell Dose on Outcome after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 May; 21(5): 889-93.
29. Wiesneth M. Gewinnung und Präparation von peripheren Blutstammzellen. In: Kiefel V., Mueller-Eckhardt C. (eds) *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie.* Springer, Berlin, Heidelberg, 2010.

30. Wang T., Shigdar S., Gantier M. P., Hou Y., Wang L., Li Y., Shamaileh H. A., Yin W., Zhou S. F., Zhao X., Duan W. Cancer stem cell targeted therapy: progress amid controversies. *Oncotarget*. 2015 Dec 29; 6(42): 44191-206.
31. Li-Sha Chen, An-Xin Wang, Bing Dong, Ke-Feng Pu, Li-Hua Yuan, and Yi-Min Zhu. *Chin J. Cancer*. A new prospect in cancer therapy: targeting cancer stem cells to eradicate cancer. 2012 Dec; 31(12): 564–572.
32. Hosseinpour B., Bakhtiarizadeh M. R., Mirabbassi S. M., Ebrahimie E. Comparison of hematopoietic cancer stem cells with normal stem cells leads to discovery of novel differentially expressed SSRs. *Gene*. 2014 Oct 15; 550(1): 10-7.
33. Horne G. A., Copland M. Approaches for targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: implications for hematological treatments. *Expert Opin Drug Discov*. 2017 May; 12(5): 465-474.
34. Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4; 144(5): 646-74.
35. Reed J. C. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*. 2000 Nov; 157(5): 1415-30.
36. Repsold L., Pool R., Karodia M., Tintinger G., Joubert A. M. An overview of the role of platelets in angiogenesis, apoptosis and autophagy in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Cell Int*. 2017 Oct 30; 17: 89.
37. Philchenkov A., Zavelevich M., Krocak T. J., Los M. *Exp Oncol*. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. 2004 Jun; 26(2): 82-97.
38. Ashkenazi A., Fairbrother W. J., Levenson J. D., Souers A. J. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2017 Apr; 16(4): 273-284.
39. Cassier P. A., Castets M., Belhabri A., Vey N. Targeting apoptosis in acute myeloid leukaemia. *Br J. Cancer*. 2017 Oct 10; 117(8): 1089-1098.
40. He Y. C., Zhou F. L., Shen Y., Liao D. F., Cao D. Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy. *Int J. Mol Sci*. 2014 May 12; 15(5): 8335-51.
41. Nuñez G., Benedict M. A., Hu Y., Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 1998 Dec 24; 17(25): 3237-45.
42. Hassan M., Watari H., AbuAlmaaty A., Ohba Y., Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 150845.
43. Bhat P., Kriel J., Shubha Priya B., Basappa, Shivananju N. S., Loos B. Modulating autophagy in cancer therapy: Advancements and challenges for cancer cell death sensitization. *Biochem Pharmacol*. 2018 Jan; 147: 170-182.
44. Abrams S. L., Ruvolo P. P., Ruvolo V. R., Ligresti G., Martelli A. M., Cocco L., Ratti S., Tafuri A., Steelman L. S., Candido S., Libra M., McCubrey J. A. Targeting signaling and

- apoptotic pathways involved in chemotherapeutic drug-resistance of hematopoietic cells. *Oncotarget*. 2017 Aug 24; 8(44): 76525-76557.
45. Krawczyk J., Keane N., Swords R., O'Dwyer M., Freeman C. L., Giles F. J. Perifosine - a new option in treatment of acute myeloid leukemia? *Expert Opin Investig Drugs*. 2013 Oct; 22(10): 1315-27.
 46. Keane N. A., Glavey S. V., Krawczyk J., O'Dwyer M. AKT as a therapeutic target in multiple myeloma. *Expert Opin Ther Targets*. 2014 Aug; 18(8): 897-915.
 47. Hennessy B. T., Lu Y., Poradosu E., Yu Q., Yu S., Hall H., Carey M. S., Ravoori M., Gonzalez-Angulo A. M., Birch R., Henderson I. C., Kundra V., Mills G. B. Pharmacodynamic markers of perifosine efficacy. *Clin Cancer Res*. 2007 Dec 15; 13(24): 7421-31.
 48. Becher O. J., Millard N. E., Modak S., Kushner B. H., Haque S., Spasojevic I., Trippett T. M., Gilheeny S. W., Khakoo Y., Lyden D. C., De Braganca K. C., Kolesar J. M., Huse J. T., Kramer K., Cheung N. V., Dunkel IJ1. A phase I study of single-agent perifosine for recurrent or refractory pediatric CNS and solid tumors. *PLoS One*. 2017 Jun 5; 12(6): e0178593.
 49. Abolfazl Avan, Ravi Narayan, Elisa Giovannetti, and Godefridus J. Peters. Role of Akt signaling in resistance to DNA-targeted therapy. *World J. Clin. Oncol*. 2016 Oct 10; 7(5): 352–369.
 50. M. Reis-Sobreiro, G. Roué, A. Moros, C. Gajate, J. de la Iglesia-Vicente, D. Colomer, and F. Mollinedo. Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Blood Cancer J*. 2013 May; 3(5): e118.
 51. Nitulescu G. M., Margina D., Juzenas P., Peng Q., Olaru O. T., Saloustros E., Fenga C., Spandidos D. A., Libra M., Tsatsakis A. M. Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *Int J Oncol*. 2016 Mar; 48(3): 869-85.
 52. Pal S. K., Reckamp K., Yu H., Figlin R. A. Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010 Nov; 19(11): 1355-66.
 53. Mundi P. S., Sachdev J., McCourt C., Kalinsky K. AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. *Br J. Clin Pharmacol*. 2016 Oct; 82(4): 943-56.
 54. Porta C., Paglino C., Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol*. 2014 Apr. 14; 4: 64.
 55. Fensterle J., Aicher B., Seipelt I., Teifel M., Engel J. Anticancer Agents *Med Chem*. Current view on the mechanism of action of perifosine in cancer. 2014 May; 14(4): 629-35.

56. Kondapaka S. B., Singh S. S., Dasmahapatra G. P., Sausville E. A., Roy K. K. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol Cancer Ther.* 2003 Nov; 2(11): 1093-103.
57. Sun H., Yu T., Li J. Co-administration of perifosine with paclitaxel synergistically induces apoptosis in ovarian cancer cells: more than just AKT inhibition. *Cancer Lett.* 2011 Nov 1; 310(1): 118-28.
58. Van der Luit A. H., Vink S. R., Klarenbeek J. B., Perrissoud D., Solary E., Verheij M., van Blitterswijk W. J. A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2007 Aug; 6(8): 2337-45.
59. Gajate C., Mollinedo F. Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood.* 2007 Jan 15; 109(2): 711-9.
60. Vink S. R., Schellens J. H., van Blitterswijk W. J., Verheij M. Tumor and normal tissue pharmacokinetics of perifosine, an oral anti-cancer alkylphospholipid. *Invest New Drugs.* 2005 Aug; 23(4): 279-86.
61. Crul M., Rosing H., de Klerk G. J., Dubbelman R., Traiser M., Reichert S., Knebel N. G., Schellens J. H., Beijnen J. H., ten Bokkel Huinink WW. Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours. *Eur J. Cancer.* 2002 Aug; 38(12): 1615-21.
62. Unger C., Berdel W., Hanauske A. R., Sindermann H., Engel J., Mross K. *Eur J. Cancer.* First-time-in-man and pharmacokinetic study of weekly oral perifosine in patients with solid tumours. 2010 Mar; 46(5): 920-5.
63. Gojo I., Perl A., Luger S., Baer M. R., Norsworthy K. J., Bauer K. S., Tidwell M., Fleckinger S., Carroll M., Sausville E. A. Phase I study of UCN-01 and perifosine in patients with relapsed and refractory acute leukemias and high-risk myelodysplastic syndrome. *Invest New Drugs.* 2013 Oct; 31(5): 1217-27.
64. Momota H., Nerio E., Holland E. C. *Cancer Res.* Perifosine inhibits multiple signaling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas *in vivo*. 2005 Aug 15; 65(16): 7429-35.
65. Rahmani M., Reese E., Dai Y., Bauer C., Payne S. G., Dent P., Spiegel S., Grant S. *Cancer Res.* Coadministration of histone deacetylase inhibitors and perifosine synergistically induces apoptosis in human leukemia cells through Akt and ERK1/2 inactivation and the generation of ceramide and reactive oxygen species. 2005 Mar 15; 65(6): 2422-32.
66. Chiarini F., Del Sole M., Mongiorgi S., Gaboardi G. C., Cappellini A., Mantovani I., Follo M. Y., McCubrey J. A., Martelli A. M. The novel Akt inhibitor, perifosine, induces

- caspase-dependent apoptosis and downregulates P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human T-acute leukemia cells by a JNK-dependent mechanism. *Leukemia*. 2008 Jun; 22(6): 1106-16.
67. Papa V., Tazzari P. L., Chiarini F., Cappellini A., Ricci F., Billi A. M., Evangelisti C., Ottaviani E., Martinelli G., Testoni N., McCubrey J. A., Martelli A. M. Proapoptotic activity and chemosensitizing effect of the novel Akt inhibitor perifosine in acute myelogenous leukemia cells. *Leukemia*. 2008 Jan; 22(1): 147-60.
 68. Hideshima T., Catley L., Yasui H., Ishitsuka K., Raje N., Mitsiades C., Podar K., Munshi N. C., Chauhan D., Richardson P. G., Anderson K. C. Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood*. 2006 May 15; 107(10): 4053-62.
 69. Hideshima T., Catley L., Raje N., Chauhan D., Podar K., Mitsiades C., Tai Y. T., Vallet S., Kiziltepe T., Ocio E., Ikeda H., Okawa Y., Hideshima H., Munshi N. C., Yasui H., Richardson P. G., Anderson K. C. Inhibition of Akt induces significant downregulation of survivin and cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Br J. Haematol*. 2007 Sep; 138(6): 783-91.
 70. Vinall R. L., Hwa K., Ghosh P., Pan C. X., Lara P. N. Jr., de Vere White R. W. Combination treatment of prostate cancer cell lines with bioactive soy isoflavones and perifosine causes increased growth arrest and/or apoptosis. *Clin Cancer Res*. 2007 Oct 15; 13(20): 6204-16.
 71. Elrod H. A., Lin Y. D., Yue P., Wang X., Lonial S., Khuri F. R., Sun S. Y. The alkylphospholipid perifosine induces apoptosis of human lung cancer cells requiring inhibition of Akt and activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Mol Cancer Ther*. 2007 Jul; 6(7): 2029-38. Epub 2007 Jun 29.
 72. Li Z., Tan F., Liewehr D. J., Steinberg S. M., Thiele C. J. *In vitro* and *in vivo* inhibition of neuroblastoma tumor cell growth by AKT inhibitor perifosine. *J. Natl Cancer Inst*. 2010 Jun 2; 102(11): 758-70.
 73. Zitzmann K., Vlotides G., Brand S., Lahm H., Spöttl G., Göke B., Auernhammer C. J. Perifosine-mediated Akt inhibition in neuroendocrine tumor cells: role of specific Akt isoforms. *Endocr Relat Cancer*. 2012 May 24; 19(3): 423-34.
 74. Argiris A., Cohen E., Karrison T., Esparaz B., Mauer A., Ansari R., Wong S., Lu Y., Pins M., Dancy J., Vokes E. A phase II trial of perifosine, an oral alkylphospholipid, in recurrent or metastatic head and neck cancer. *Cancer Biol. Ther*. 2006 Jul; 5(7): 766-70.
 75. Vink S. R., Lagerwerf S., Mesman E., Schellens J. H., Begg A. C., van Blitterswijk W. J., Verheij M. Radiosensitization of squamous cell carcinoma by the alkylphospholipid perifosine in cell culture and xenografts. *Clin. Cancer Res*. 2006 Mar 1; 12(5): 1615-22.

76. Vink S. R., van Blitterswijk W. J., Schellens J. H., Verheij M. Rationale and clinical application of alkylphospholipid analogues in combination with radiotherapy. *Cancer Treat Rev.* 2007 Apr; 33(2): 191-202.
77. Yuanhong Gao, Hiromichi Ishiyama, Mianen Sun, Kathryn L. Brinkman, Xiaozhen Wang, Julie Zhu, Weiyuan Mai, Ying Huang, Daniel Floryk, Michael Ittmann, Timothy C. Thompson, E. Brian Butler, Bo Xu and Bin S. Teh. The alkylphospholipid, perifosine, radiosensitizes prostate cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Radiat Oncol.* 2011; 6: 39.
78. Vink SR, Schellens JH, Beijnen JH, Sindermann H, Engel J, Dubbelman R, Moppi G, Hillebrand MJ, Bartelink H, Verheij M. Phase I and pharmacokinetic study of combined treatment with perifosine and radiation in patients with advanced solid tumours. *Radiother Oncol.* 2006 Aug;80(2):207-13.
79. Yin Tong, Yan-yan Liu, Liang-shun You and Wen-bin Qian. Perifosine induces protective autophagy and upregulation of ATG5 in human chronic myelogenous leukemia cells *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin.* 2012 Apr; 33(4): 542–550.
80. Meng H., Jin Y., Liu H., You L., Yang C., Yang X., Qian W. SNS-032 inhibits mTORC1/mTORC2 activity in acute myeloid leukemia cells and has synergistic activity with perifosine against Akt. *J. Hematol Oncol.* 2013 Feb 18; 6: 18.
81. Cani A., Simioni C., Martelli A. M., Zauli G., Tabellini G., Ultimo S., McCubrey J. A., Capitani S., Neri L. M. Triple Akt inhibition as a new therapeutic strategy in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* 2015 Mar 30; 6(9): 6597-610.
82. Friedman D. R., Lanasa M. C., Davis P. H., Allgood S. D., Matta K. M., Brander D. M., Chen Y., Davis E. D., Volkheimer A. D., Moore J. O., Gockerman J. P., Sportelli P., Weinberg J. B. Perifosine treatment in chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II clinical trial and *in vitro* studies. *Leuk. Lymphoma.* 2014 May; 55(5): 1067-75.
83. Laixi Bi, Junqing Wu, Aifang Ye, Jianbo Wu, Kang Yu, Shenghui Zhang and Yixiang Han. Increased Th17 cells and IL-17A exist in patients with B cell acute lymphoblastic leukemia and promote proliferation and resistance to daunorubicin through activation of Akt signaling *J. Transl. Med.* 2016; 14: 132.
84. Guidetti A., Carlo-Stella C., Locatelli S. L., Malorni W., Mortarini R., Viviani S., Russo D., Marchianò A., Sorasio R., Doderò A., Farina L., Giordano L., Di Nicola M., Anichini A., Corradini P., Gianni A. M. Phase II study of perifosine and sorafenib dual-targeted therapy in patients with relapsed or refractory lymphoproliferative diseases. *Clin. Cancer Res.* 2014 Nov 15; 20(22): 5641-51.
85. Civallero M., Cosenza M., Marcheselli L., Pozzi S., Sacchi S. NVP-BEZ235 alone and in combination in mantle cell lymphoma: an effective therapeutic strategy. *Expert Opin Investig Drugs.* 2012 Nov; 21(11): 1597-606.

86. Locatelli S. L., Giacomini A., Guidetti A., Cleris L., Mortarini R., Anichini A., Gianni A. M., Carlo-Stella C. Perifosine and Sorafenib combination induces mitochondrial cell death and antitumor effects in NOD/SCID mice with Hodgkin lymphoma cell line xenografts. *Leukemia*. 2013 Aug; 27(8): 1677-87.
87. Van Ummersen L., Binger K., Volkman J., Marnocha R., Tutsch K., Kolesar J., Arzoomanian R., Alberti D., Wilding G. A phase I trial of perifosine (NSC 639966) on a loading dose/maintenance dose schedule in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Nov 15; 10(22): 7450-6.
88. Catley L., Hideshima T., Chauhan D., Neri P., Tassone P., Bronson R., Song W., Tai Y. T., Munshi N. C., Anderson K. C. Alkyl phospholipid perifosine induces myeloid hyperplasia in a murine myeloma model. *Exp Hematol*. 2007 Jul; 35(7): 1038-46.
89. Xavier Leleu, Xiaoying Jia, Judith Runnels, Hai T. Ngo, Anne-Sophie Moreau, Mena Farag, Joel A. Spencer, Costas M. Pitsillides, Evdoxia Hatjiharissi, Aldo Roccaro, Garrett O'Sullivan, Douglas W. McMillin, Daisy Moreno, Tanyel Kiziltepe, Ruben Carrasco, Steven P. Treon, Teru Hideshima, Kenneth C. Anderson, Charles P. Lin and Irene M. Ghobrial. The Akt pathway regulates survival and homing in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*. 2007 Dec 15; 110(13): 4417-4426.
90. Jakubowiak A. J., Richardson P. G., Zimmerman T., Alsina M., Kaufman J. L., Kandarpa M., Kraftson S., Ross C. W., Harvey C., Hideshima T., Sportelli P., Poradosu E., Gardner L., Giusti K., Anderson K. C. Perifosine plus lenalidomide and dexamethasone in relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma: a Phase I Multiple Myeloma Research Consortium study. *Br. J. Haematol*. 2012 Aug; 158(4): 472-80.
91. Richardson P. G., Wolf J., Jakubowiak A., Zonder J., Lonial S., Irwin D., Densmore J., Krishnan A., Raje N., Bar M., Martin T., Schlossman R., Ghobrial I. M., Munshi N., Laubach J., Allerton J., Hideshima T., Colson K., Poradosu E., Gardner L., Sportelli P., Anderson K. C. Perifosine plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed/refractory multiple myeloma previously treated with bortezomib: results of a multicenter phase I/II trial. *J. Clin. Oncol*. 2011 Nov. 10; 29(32): 4243-9.
92. Orłowski R. Z. Novel agents for multiple myeloma to overcome resistance in phase III clinical trials. *Semin. Oncol*. 2013 Oct; 40(5): 634-51.
93. El-Amm J., Tabbara I. A. Emerging therapies in multiple myeloma. *Am J. Clin. Oncol*. 2015 Jun; 38(3): 315-21.
94. David E., Sinha R., Chen J., Sun. S. Y., Kaufman J. L., Lonial S. Perifosine synergistically enhances TRAIL-induced myeloma cell apoptosis via up-regulation of death receptors. *Clin. Cancer Res*. 2008 Aug 15; 14(16): 5090-8.

95. Richardson P. G., Nagler A., Ben-Yehuda D., Badros A., Hari P., Hajek R., Spicka I., Kaya H., Le Blanc R., Yoon S. S., Kim K., Martinez-Lopez J., Mittelman M., Shpilberg O., Tothova E., Laubach J. P., Ghobria I. M., Leiba M., Gatt M. E., Sportelli P., Chen M., Anderson K. C. Randomized Placebo-Controlled Phase III Study Of Perifosine Combined With Bortezomib and Dexamethasone In Relapsed, Refractory Multiple Myeloma Patients Previously Treated With Bortezomib. *Blood* 2013 ASH Meeting Proceedings; 122: abstract 3189.
96. Srivastava N., Cho D. C. Perifosine in renal cell carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs*. 2013 Feb; 22(2): 285-91.
97. Ernst D. S., Eisenhauer E., Wainman N., Davis M., Lohmann R., Baetz T., Belanger K., Smylie M. Phase II study of perifosine in previously untreated patients with metastatic melanoma. *Invest New Drugs*. 2005 Dec; 23(6):569-75.
98. Knowling M., Blackstein M., Tozer R., Bramwell V., Dancey J., Dore N., Matthews S., Eisenhauer E. A phase II study of perifosine (D-21226) in patients with previously untreated metastatic or locally advanced soft tissue sarcoma: A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial. *Invest New Drugs*. 2006 Sep; 24(5): 435-9.
99. Bailey HH, Mahoney MR, Ettinger DS, Miles WJ, Fracasso PM, Traynor AM, Erlichman C, Okuno SH. Phase II study of daily oral perifosine in patients with advanced soft tissue sarcoma. *Cancer*. 2006 Nov 15;107(10):2462-7.
100. Leigh N. B., Dent S., Clemons M., Vandenberg T. A., Tozer R., Warr D. G., Crump R. M., Hedley D., Pond G. R., Dancey J. E., Moore M. J. A Phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Mar; 108(1): 87-92.
101. Posadas E. M., Gulley J., Arlen P. M., Trout A., Parnes H. L., Wright J., Lee M. J., Chung E. J., Trepel J. B., Sparreboom A., Chen C., Jones E., Steinberg S. M., Daniels A., Figg W. D., Dahut W. L. A phase II study of perifosine in androgen independent prostate cancer. *Cancer Biol. Ther*. 2005 Oct; 4(10): 1133-7.
102. Marsh Rde. W., Rocha Lima C. M., Levy D. E., Mitchell E. P., Rowland K. M. Jr., Benson A. B. 3rd. A phase II trial of perifosine in locally advanced, unresectable, or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Am J. Clin. Oncol*. 2007 Feb; 30(1): 26-31.
103. Bendell J. C., Nemunaitis J., Vukelja S. J., Hagenstad C., Campos L. T., Hermann R. C., Sportelli P., Gardner L., Richards D. A. Randomized placebo-controlled phase II trial of perifosine plus capecitabine as second- or third-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol*. 2011 Nov 20; 29(33): 4394-400.
104. Johanna C. Bendell, Thomas J. Ervin, Neil N. Senzer, Donald A. Richards, Irfan Firdaus, A. Craig Lockhart, Allen Lee Cohn, Mansoor N. Saleh, Lesa R. Gardner, Peter Sportelli, Cathy Eng. Results of the X-PECT study: A phase III randomized double-blind, placebo-

- controlled study of perifosine plus capecitabine (P-CAP) versus placebo plus capecitabine (CAP) in patients (pts) with refractory metastatic colorectal cancer (mCRC). *Journal of Clinical Oncology*. Vol. 30, No. 18_suppl, June 20, 2012 (Volume Supplement).
105. Lange F., Franz B., Maletzki C., Linnebacher M., Hühns M., Jaster R. Biological and molecular effects of small molecule kinase inhibitors on low-passage human colorectal cancer cell lines. *Biomed Res. Int.* 2014; 2014: 568693.
 106. Kushner B. H., Cheung N. V., Modak S., Becher O. J., Basu E. M., Roberts S. S., Kramer K., Dunkel I. J. A phase I/Ib trial targeting the Pi3k/Akt pathway using perifosine: Long-term progression-free survival of patients with resistant neuroblastoma. *Int J Cancer*. 2017 Jan 15; 140(2): 480-484.
 107. Al Sawah E., Chen X., Marchion D. C., Xiong Y., Ramirez I. J., Abbasi F., Bou Zgheib N., Chon H. S., Wenham R. M., Apte. S. M., Judson P. L., Lancaster J. M. Perifosine, an AKT inhibitor, modulates ovarian cancer cell line sensitivity to cisplatin-induced growth arrest. *Gynecol. Oncol.* 2013 Oct; 131(1): 207-12.
 108. Amantini C., Morelli M. B., Santoni M., Soriani A., Cardinali C., Farfariello V., Eleuteri A. M., Bonfili L., Mozzicafreddo M., Nabissi M., Cascinu S., Santoni G. Sorafenib induces Cathepsin B-mediated apoptosis of bladder cancer cells by regulating the Akt/PTEN pathway. The Akt inhibitor, Perifosine, enhances the Sorafenib-induced cytotoxicity against bladder cancer cells. *Oncoscience*. 2015 Mar 23; 2(4): 395-409.
 109. Xin Y., Shen X. D., Cheng L., Hong D. F., Chen B. Perifosine inhibits S6K1-Gli signaling and enhances gemcitabine-induced anti-pancreatic cancer efficiency. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014 Apr; 73(4): 711-9.
 110. Fei H. R., Chen G., Wang J. M., Wang F. Z. Perifosine induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines by blockade of Akt phosphorylation. *Cytotechnology*. 2010 Oct; 62(5): 449-60.
 111. Kim M. N., Ro S. W., Kim D. Y., Kim da Y., Cho K. J., Park J. H., Lim H. Y., Han K. H. Efficacy of perifosine alone and in combination with sorafenib in an HrasG12V plus shp53 transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015 Aug; 76(2): 257-67.
 112. Pinton G., Manente A. G., Angeli G., Mutti L., Moro L. Perifosine as a potential novel anti-cancer agent inhibits EGFR/MET-AKT axis in malignant pleural mesothelioma. *PLoS One*. 2012; 7(5): e36856.
 113. Le Grand M., Berges R., Pasquier E., Montero M. P., Borge L., Carrier A., Vasseur S., Bourgarel V., Buric D., André N., Braguer D1, Carré M. Akt targeting as a strategy to boost chemotherapy efficacy in non-small cell lung cancer through metabolism suppression. *Sci Rep*. 2017 Mar 23; 7: 45136.

114. Shen J., Xu L., Zhao Q. Perifosine and ABT-737 synergistically inhibit lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 May 13; 473(4): 1170-1176.
115. Ito K., Ota A., Ono T., Nakaoka T., Wahiduzzaman M., Karnan S., Konishi H., Furuhashi A., Hayashi T., Yamada Y., Hosokawa Y., Kazaoka Y. Inhibition of Nox1 induces apoptosis by attenuating the AKT signaling pathway in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oncol Rep*. 2016 Nov; 36(5): 2991-2998. Epub 2016 Sep 5.
116. Qin L. S., Yu Z. Q., Zhang S. M., Sun G., Zhu J., Xu J., Guo J., Fu L. S. The short chain cell-permeable ceramide (C6) restores cell apoptosis and perifosine sensitivity in cultured glioblastoma cells. *Mol Biol Rep*. 2013 Oct; 40(10)45-55.
117. Wu Y. L., Maachani U. B., Schweitzer M., Singh R., Wang M., Chang R., Souweidane M. M. Dual Inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK Pathways Induces Synergistic Antitumor Effects in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Cells. *Transl Oncol*. 2017 Apr; 10(2): 221-228.
118. Yong K., Gonzalez-McQuire S., Szabo Z., Schoen P., Hajek R. The start of a new wave: Developments in proteasome inhibition in multiple myeloma. *Eur J. Haematol*. 2018 Mar 30.
119. Meregalli C. An Overview of Bortezomib-Induced Neurotoxicity. *Toxics*. 2015 Jul 27; 3(3): 294-303.
120. Goldschmidt H. Bortezomib - von der Innovation zum Therapiestandard beim multiplen Myelom. *Thieme Drug Report* 2014; 8 (11): 1-12.
121. Gandolfi S., Laubach J. P., Hideshima T., Chauhan D., Anderson K. C., Richardson P. G. The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer Metastasis Rev*. 2017 Dec; 36(4): 561-584.
122. Guedes R. A., Serra P., Salvador J. A., Guedes R. C. Computational Approaches for Discovery of Human Proteasome Inhibitors: An Overview. *Molecules*. 2016 Jul 16; 21(7). pii: E927.
123. Fairfield H., Falank C., Avery L., Reagan M. R. Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Ann N. Y. Acad Sci*. 2016 Jan; 1364: 32-51.
124. Venumadhav Kotla, Swati Goel, Sangeeta Nischal, Christoph Heuck, Kumar Vivek, Bhaskar Das and Amit Verma. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *Journal of Hematology & Oncology* 2009, 2: 36.
125. Sarah A. Holstein, Vera J. Suman and Philip L. McCarthy. Update on the role of lenalidomide in patients with multiple myeloma. *Ther. Adv. Hematol*. 2018 Jul; 9(7): 175–190.
126. Nianhang Chen, corresponding author Simon Zhou, and Maria Palmisano. Clinical Pharma-cokinetics and Pharmacodynamics of Lenalidomide. *Clin Pharmacokinet*. 2017; 56(2): 139–152.

127. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J. Cancer Res Ther.* 2014 Oct-Dec; 10(4): 853-8.
128. Menna P., Salvatorelli E. Primary Prevention Strategies for Anthracycline Cardiotoxicity: A Brief Overview. *Chemotherapy.* 2017; 62(3): 160-168.
129. Vivien H. C. Bramwell, Dale Anderson and Manya L. Charette. Doxorubicin-Based Chemotherapy for the Palliative Treatment of Adult Patients with Locally Advanced or Metastatic Soft-Tissue Sarcoma: A Meta-Analysis and Clinical Practice Guideline *Sarcoma.* 2000 Sep; 4(3): 103–112.
130. Tacar O., Sriamornsak P., Dass C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. Pharm Pharmacol.* 2013 Feb; 65(2): 157-70.
131. Agudelo D., Bérubé G., Tajmir-Riahi H. A. An overview on the delivery of antitumor drug doxorubicin by carrier proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016 Jul; 88: 354-60.
132. Volpe D. A., Warren M. K. Myeloid clonogenic assays for comparison of the *in vitro* toxicity of alkylating agents. *Toxicology in vitro* Volume 17, Issue 3, June 2003, Pages 271-277.
133. Sack U., Tárnok A., Rothe G. (Hrsg): *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.* Basel, Karger, 2007, pp 1-26.
134. Herzenberg L. A., Parks D., Sahaf B., Perez O., Roederer M., Herzenberg L. A. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin. Chem.* 2002 Oct; 48(10): 1819-27.
135. Davey H. M., Kell D. B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.* 1996 Dec; 60(4): 641-96.
136. Givan A. L. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol. Biol.* 2011; 699: 1-29.
137. Gelsleichter, Gown A. M., Zarbo R. J., Wang E., Coltrera M. D. p53 and mdm-2 expression in malignant melanoma: an immunocytochemical study of expression of p53, mdm-2, and markers of cell proliferation in primary versus metastatic tumors. *Mod Pathol.* 1995 Jun; 8(5): 530-5.
138. Straume O., Sviland L., Akslen L. A. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2000 May; 6(5): 1845-53.
139. Ramsay J. A., From L., Iscoe N. A., Kahn H. J. MIB-1 proliferative activity is a sign. prognostic factor in primary thick cutaneous melanomas. *J. Invest Dermatol.* 1995 Jul; 105(1): 22-6.

140. Karlsson M., Boeryd B., Carstensen J., Frånlund B., Gustafsson B., Kågedal B., Sun X. F., Wingren S. Correlations of Ki-67 and PCNA to DNA ploidy, S-phase fraction and survival in uveal melanoma. *Eur J. Cancer.* 1996 Feb; 32A(2): 357-62.
141. Kanter L., Blegen H., Wejde J., Lagerlöf B., Larsson O. Utility of a proliferation marker in distinguishing between benign naevocellular naevi and naevocellular naevus-like lesions with malignant properties. *Melanoma Res.* 1995 Oct; 5(5): 345-50.
142. Boer K., Deufel T., Reinhoefer M. Evaluation of the XE-5000 for the automated analysis of blood cells in cerebrospinal fluid. *Clin. Biochem.* 2009 May; 42(7-8): 684-91.
143. Perné A., Hainfellner J. A., Womastek I., Haushofer A., Szekeres T., Schwarzingler I. Performance evaluation of the Sysmex XE-5000 hematology analyzer for white blood cell analysis in cerebrospinal fluid. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2012 Feb; 136(2): 194-8.
144. Sysmex. Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Hämatologie: XE-5000 Case Manager. Technologie, Hämatologie, Sysmex Xtra, Themenblatt. 1/2009.
145. Sysmex. Messtechnologie der XN-Serie. Xtra Vol. 17.1 | 2013 | Nr. 01.
146. Sysmex. Muster-Standardarbeitsanweisung SYSMEX Hämatologie-System XE-5000 1. Dokumentenname / Version: 2 SOP XE-5000. 11 2010.
147. Matsumoto H.: The technology of reagents in the automated hematology analyzer Sysmex XE-2100-red fluorescence reaction. *Sysmex J. Int.*, 9: 179-184, 1999.
148. Ishii T., Kawasumi I., Matsumoto H.: SE-9000 IMI channel: Focusing on the roles and functions of surfactant. *Sysmex J. Int.* 1997; 7: 123–128.
149. Kondo T. Hemolysis by surface-active agents. *Hyomen* 1967; 5:630-635.
150. Eugene L. G. Lipids of human leukocytes: relation to cell type. *Journal of Lipid Research* 1967; 8:321-327.
151. Eugene L. G. (1972) Lipid patterns of leukocytes in health and disease. *Seminars Hematology* 1972; 9:241-50.
152. Linssen J, Aderhold S, Nierhaus A, Frings D, Kaltschmidt C, Zänker K. Automation and validation of a rapid method to assess neutrophil and monocyte activation by routine fluorescence flow cytometry *in vitro*. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008 Sep;74(5):295-309.
153. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg.* 1938; 27: 493-497.
154. Chou T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* 2006 Sep; 58(3): 621-81.
155. Bijnsdorp I. V., Giovannetti E., Peters G. J. Analysis of drug interactions. *Methods Mol Biol.* 2011; 731: 421-34.
156. Schmidt-Hieber M, Dabrowski R, Aicher B, Lohneis P, Busse A, Tietze-Buerger C, Reufi

- B, Thiel E, Blau IW. *In vitro* effects of perifosine, bortezomib and lenalidomide against hemato-poietic progenitor cells from healthy donors. *Invest New Drugs*. 2012 Aug; 30(4):1396-403.
157. Schmidt-Hieber M, Dabrowski R, Weimann A, Aicher B, Lohneis P, Busse A, Thiel E, Blau IW. *In vitro* cytotoxicity of the novel antimyeloma agents perifosine, bortezomib and lenalidomide against different cell lines. *Invest New Drugs*. 2012 Apr;30(2):480-9.
158. Figg WD, Monga M, Headlee D, Shah A, Chau CH, Peer C, Messman R, Elsayed YA, Murgu AJ, Melillo G, Ryan QC, Kalnitskiy M, Senderowicz AM, Hollingshead M, Arbuck SG, Sausville EA. A phase I and pharmacokinetic study of oral perifosine with different loading schedules in patients with refractory neoplasms. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014 Nov;74(5):955-67.
159. Richardson PG, Eng C, Kolesar J, Hideshima T, Anderson KC. Perifosine, an oral, anti-cancer agent and inhibitor of the Akt pathway: mechanistic actions, pharmacodynamics, pharma-cokinetics and clinical activity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2012 May;8(5):623-33.
160. Egler J, Lang F. Triggering of Eryptosis, the Suicidal Erythrocyte Death, by Perifosine. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(6):2534-2544.
161. Servida F, Soligo D, Delia D, Henderson C, Brancolini C, Lombardi L, Deliliers GL. Sensitivity of human multiple myelomas and myeloid leukemias to the proteasome inhibitor I. *Leukemia*. 2005 Dec;19(12):2324-31.
162. Hassan SB, Haglund C, Aleskog A, Larsson R, Lindhagen E. Primary lymphocytes as predictors for species differences in cytotoxic drug sensitivity. *Toxicol In Vitro*. 2007 Sep;21(6):1174-81.
163. Reece DE, Sullivan D, Lonial S, Mohrbacher AF, Chatta G, Shustik C, Burris H 3rd, Venkatakrisnan K, Neuwirth R, Riordan WJ, Karol M, von Moltke LL, Acharya M, Zannikos P, Keith Stewart A. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of two doses of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011 Jan;67(1):57-67.
164. Orłowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, Shea TC, Baldwin AS, Stahl S, Adams J, Esseltine DL, Elliott PJ, Pien CS, Guerciolini R, Anderson JK, Depcik-Smith ND, Bhagat R, Lehman MJ, Novick SC, O'Connor OA, Soignet SL. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2002 Nov 15;20(22):4420-7.
165. Ortho-Biotech, Division of Janssen-Cilag. Velcade® Produktmonographie. 12/2009: 65-96.
166. Chen N, Zhou S, Palmisano M. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Lenalidomide. *Clin Pharmacokinet*. 2017 Feb;56(2):139-152.

167. Ebert BL, Galili N, Tamayo P, Bosco J, Mak R, Pretz J, Tanguturi S, Ladd-Acosta C, Stone R, Golub TR, Raza A. An erythroid differentiation signature predicts response to lenalidomide in myelodysplastic syndrome. *PLoS Med.* 2008 Feb;5(2):e35.
168. Narla A, Dutt S, McAuley JR, Al-Shahrour F, Hurst S, McConkey M, Neuberg D, Ebert BL. Dexamethasone and lenalidomide have distinct functional effects on erythropoiesis. *Blood.* 2011 Aug 25;118(8):2296-304.
169. Pal R, Monaghan SA, Hassett AC, Mapara MY, Schafer P, Roodman GD, Ragni MV, Moscinski L, List A, Lentzsch S. Immunomodulatory derivatives induce PU.1 down-regulation, myeloid maturation arrest, and neutropenia. *Blood.* 2010 Jan 21;115(3):605-14.
170. Li S, Fu J, Wang H, Ma H, Xu X, Yang YG, Deng S, Mapara MY, Lentzsch S. IMiD compounds affect CD34⁺ cell fate and maturation via CRBN-induced IKZF1 degradation. *Blood Adv.* 2018 Mar 13;2(5):492-504.
171. Fink EC, Ebert BL. The novel mechanism of lenalidomide activity. *Blood.* 2015 Nov 19;126(21):2366-9.
172. Maria Ximeri, Athanasios Galanopoulos, Mirjam Klaus, Agapi Parcharidou, Krinio Giannikou, Maria Psyllaki, Argyrios Symeonidis, Vasiliki Pappa, Zafiris Kartasis, Dimitra Liapi, Eleftheria Hatzimichael, Styliani Kokoris, Penelope Korkolopoulou, Constantina Sambani, Charalampos Pontikoglou, and Helen A. Papadaki. Effect of lenalidomide therapy on hematopoiesis of patients with myelodysplastic syndrome associated with chromosome 5q deletion. *Haematologica.* 2010 Mar; 95(3): 406–414.
173. Stahl M, Zeidan AM. Lenalidomide use in myelodysplastic syndromes: Insights into the biologic mechanisms and clinical applications. *Cancer.* 2017 May 15;123(10):1703-1713.
174. Mikkael A. Sekeres, Jaroslaw P. Maciejewski, Aristotle A.N. Giagounidis, Kenton Wride, Robert Knight, Azra Raza, and Alan F. List. Relationship of Treatment-Related Cytopenias and Response to Lenalidomide in Patients With Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol.* 2008 Dec 20; 26(36): 5943–5949.
175. Eksborg S1. Pharmacokinetics of anthracyclines. *Acta Oncol.* 1989;28(6):873
176. Mahajan S, Tandon N, Kumar S. The evolution of stem-cell transplantation in multiple myeloma. *Ther Adv Hematol.* 2018 May;9(5):123-133.
177. Rajkumar SV. Myeloma today: Disease definitions and treatment advances. *Am J Hematol.* 2016 Jan;91(1):90-100.
178. Chauhan D, Singh AV, Ciccarelli B, Richardson PG, Palladino MA, Anderson KC. Combination of novel proteasome inhibitor NPI-0052 and lenalidomide trigger *in vitro* and *in vivo* synergistic cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood.* 2010 Jan 28;115(4):834-45.
179. Görgün G, Calabrese E, Soydan E, Hideshima T, Perrone G, Bandi M, Cirstea D, Santo L, Hu Y, Tai YT, Nahar S, Mimura N, Fabre C, Raje N, Munshi N, Richardson P, Anderson

- KC. Immunomodulatory effects of lenalidomide and pomalidomide on interaction of tumor and bone marrow accessory cells in multiple myeloma. *Blood*. 2010 Oct 28;116(17):3227-37.
180. Verhelle D, Corral LG, Wong K, Mueller JH, Moutouh-de Parseval L, Jensen-Pergakes K, Schafer PH, Chen R, Glezer E, Ferguson GD, Lopez-Girona A, Muller GW, Brady HA, Chan KW. Lenalidomide and CC-4047 inhibit the proliferation of malignant B cells while expanding normal CD34⁺ progenitor cells. *Cancer Res*. 2007 Jan 15;67(2):746-55.
181. Semeraro M, Galluzzi L. Novel insights into the mechanism of action of lenalidomide. *Oncoimmunology*. 2014 Feb 1;3:e28386.
182. Ziogas DC, Terpos E, Kastritis E, Dimopoulos MA. An overview of the role of carfilzomib in the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Pharmacother*. 2017 Dec;18(17):1883-1897.
183. Gavriatopoulou M, Terpos E, Kastritis E, Dimopoulos MA. Efficacy and safety of elotuzumab for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Drug Saf*. 2017 Feb;16(2):237-245.
184. Brown JS, Banerji U. Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments. *Pharmacol Ther*. 2017 Apr;172:101-115.
185. Siveen KS, Uddin S, Mohammad RM. Targeting acute myeloid leukemia stem cell signaling by natural products. *Mol Cancer*. 2017 Jan 30;16(1):13.
186. Mimura N, Hideshima T, Shimomura T, Suzuki R, Ohguchi H, Rizq O, Kikuchi S, Yoshida Y, Cottini F, Jakubikova J, Cirstea D, Gorgun G, Minami J, Tai YT, Richardson PG, Utsugi T, Iwama A, Anderson KC. Selective and potent Akt inhibition triggers anti-myeloma activities and enhances fatal endoplasmic reticulum stress induced by proteasome inhibition. *Cancer Res*. 2014 Aug 15;74(16):4458-69.
187. Spencer A, Yoon SS, Harrison SJ, Morris SR, Smith DA, Brigandi RA, Gauvin J, Kumar R, Opalinska JB, Chen C. *Blood*. The novel AKT inhibitor afuresertib shows favorable safety, pharmacokinetics, and clinical activity in multiple myeloma. 2014 Oct 2;124(14):2190-5.
188. Valerie M, Jansen, Ingrid A. Mayer, and Carlos L. Arteaga. Is There a Future for AKT Inhibitors in the Treatment of Cancer? *Clin Cancer Res*. 2016 Jun 1; 22(11): 2599–2601.

7. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Robert Dabrowski, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose an normalen hämatopoetischen Progenitorzellen und an Zellen aus Linien hämatopoetischer Malignome unter dem Einfluss von Perifosin und in Kombination mit neuen Tumorthapeutika“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

8. Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Robert Dabrowski hatte Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Schmidt-Hieber M, Dabrowski R, Aicher B, Lohneis P, Busse A, Tietze-Buerger C, Reufi B, Thiel E, Blau IW. *In vitro* effects of perifosine, bortezomib and lenalidomide against hematopoietic progenitor cells from healthy donors. Invest New Drugs. 2012 Aug; 30(4):1396-403.

Beitrag im Einzelnen: eigenständige Vorbereitung und Durchführung aller Versuchsansätze wie unter Kapitel 3 „Materialien und Methoden“ aufgeführt, eigenständige und vollständige tabellarische Zusammenfassung der Primärdaten, Beteiligung an der statistischen Datenauswertung (siehe Kapitel 4 „Ergebnisse“) sowie Beteiligung am Verfassen der Publikation

Publikation 2:

Schmidt-Hieber M, Dabrowski R, Weimann A, Aicher B, Lohneis P, Busse A, Thiel E, Blau IW. *In vitro* cytotoxicity of the novel antimyeloma agents perifosine, bortezomib and lenalidomide against different cell lines. Invest New Drugs. 2012 Apr; 30(2):480-9.

Beitrag im Einzelnen: eigenständige Vorbereitung und Durchführung aller Versuchsansätze wie unter Kapitel 3 „Materialien und Methoden“ aufgeführt, eigenständige und vollständige tabellarische Zusammenfassung der Primärdaten, Beteiligung an der statistischen Datenauswertung (siehe Kapitel 4 „Ergebnisse“) sowie Beteiligung am Verfassen der Publikation

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem vormaligen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Igor Wolfgang Blau für die Bereitstellung des interessanten Themas und die stete Unterstützung danken.

In ganz besonderem Maße möchte ich auch meinem Betreuer und späteren Doktorvater Herrn PD Dr. Martin Schmidt-Hieber für die vielen freundschaftlichen und hilfreichen Diskussionen bei wissenschaftlichen und klinischen Fragestellungen während des intensiven Zeitabschnitts der experimentellen Versuche im Labor und auch während des Zeitabschnitts der Fertigstellung der Dissertation danken.

Für die Unterstützung bei meiner Durchführung der experimentellen Versuche an hämatopoetischen Progenitorzellen und malignen Zelllinien unter Einsatz klonogener CFU-Assays, Trypanblaumessungen, Durchflusszytometrie, immunhistochemischer Verfahren und der IMI-Technik sowie Unterstützung bei der Auswertung möchte ich mich bei Frau Birgit Reufi, Frau Carola Tietze-Buerger, Frau Annika Nonnenmacher, Herrn PD Dr. Philipp Lohneis, Herrn PD Dr. Dr. Andreas Weimann und Frau Dr. Babette Aicher bedanken.

Ebenso bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Kollegen der Medizinischen Klinik III, Campus Benjamin Franklin der Charité, die mich unterstützt haben und hier namentlich nicht genannt sind.

Abschließend möchte ich mich bei Frau Astrid Kerzel, Herrn Dr. med. Hagen Kahlbau und insbesondere bei meiner Partnerin Tina Pietzsch und meiner Mutter Iwona Dabrowska bedanken, die mir mit interessanten Diskussionen und Kommentaren sowie hilfreichen Ratschlägen zur Seite standen!