

Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik II
mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

PIM-Signalnetzwerk bei Zelllinien diffuser großzelliger
B-Zell-Lymphome

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kira-Denise Golze

aus Stuttgart

Datum der Promotion: 16.06.2018

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
ZUSAMMENFASSUNG.....	9
1 EINLEITUNG.....	13
1.1 DAS DIFFUSE GROßZELLIGE B-ZELL-LYMPHOM.....	13
1.1.1 Epidemiologie	13
1.1.2 Klinik	13
1.1.3 Klassifikation und Stadieneinteilung	13
1.1.4 Subgruppen beim DLBCL.....	14
1.1.5 Therapie.....	19
1.2 DAS PIM-SIGNALNETZWERK	23
1.2.1 Die PIM – Inhibitoren SGI-1773, SGI-1776 und LGB321	26
1.3 DER PI3K/AKT/MTOR-SIGNALWEG	27
1.3.1 Der mTOR-Inhibitor RAD001	29
1.4 CAP-ABHÄNGIGE MRNA-TRANSLATION.....	31
1.5 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	33
2 MATERIAL UND METHODEN.....	36
2.1 MATERIALIEN.....	36
2.1.1 Arzneistoffe.....	36
2.1.2 Antikörper.....	36
2.1.3 Fertigungskits und Chemikalien	37
2.1.4 Puffer und Lösungen	38
2.1.5 Verbrauchsmaterial.....	39
2.1.6 Geräte	40
2.1.7 Software.....	41
2.2 ZELLKULTUR.....	41
2.2.1 Zelllinien.....	41
2.2.2 Kultivierung	41
2.2.3 Präparation primärer DLBCL-Zellen aus humanem Lymphknoten	43
2.2.4 Zellzahlbestimmung.....	43
2.2.5 Behandlung mit Substanzen.....	43
2.3 MTT-TEST	44
2.4 ZELLYKLUSANALYSE.....	44
2.5 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) UND WESTERN BLOT.....	46
2.5.1 Proteinextraktion.....	46
2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA Protein Assay Kit.....	46
2.5.3 SDS-Polyacrylamidgel-Gelelektrophorese	46
2.5.4 Western Blot mit Semi-Dry-Transfer.....	47
2.5.5 Detektion der Proteine	48
2.5.6 7-methyl Guanosintriphosphat (m ⁷ GTP) pull-down Assay	48
2.6 STATISTISCHE ANALYSEN.....	49
3 ERGEBNISSE.....	51
3.1 PIM-INHIBITOREN HEMMEN DIE PROLIFERATION VON DLBCL-ZELLINIEN.....	51
3.2 DER PIM-INHIBITOR LGB321 FÜHRT IN KOMBINATION MIT DEM mTOR-INHIBITOR RAD001 UND DEM ANTI-CD20-ANTIKÖRPER RITUXIMAB ZU VERSTÄRKTEN EFFEKTEN AUF DIE PROLIFERATIONSHEMMUNG	54
3.2.1 Wirkung des mTOR-Inhibitors RAD001 auf die Proliferation	54
3.2.2 Wirkung des anti-CD20-Antikörpers Rituximab auf die Proliferation.....	54
3.2.3 Kombination der PIM-Inhibitoren SGI-1176 und LGB321 mit RAD001 und Rituximab.....	55
3.3 ZELLYKLUSARREST IN DER G ₁ -PHASE UND VERMEHRTER ZELLTOD ALS ERKLÄRUNG FÜR DIE PROLIFERATIONSHEMMUNG?	59
3.4 SCHUTZMECHANISMUS AUTOPHAGIE ALS ERKLÄRUNG FÜR DIE PROLIFERATIONSHEMMUNG?.....	60
3.5 APOPTOSE ALS ERKLÄRUNG FÜR DIE PROLIFERATIONSHEMMUNG?	61
3.6 AUSWIRKUNGEN DER SUBSTANZEN AUF DEN PI3-KINASE/AKT/MTOR-SIGNALWEG, DEN PIM-SIGNALWEG UND DEN ERK-SIGNALWEG	64

3.6.1	Nachweis von Schlüsselproteinen	64
3.6.2	Herunterregulation der Schlüsselproteine	67
3.7.	AUSWIRKUNGEN DER SUBSTANZEN AUF DIE CAP-ABHÄNGIGE MRNA-TRANSLATION	68
4	DISKUSSION	72
4.1	WIRKSAMKEIT DER UNTERSUCHTEN SUBSTANZEN AUF DIE PROLIFERATION	74
4.1.1	PIM-Inhibitoren SGI-1773, SGI1776 und LGB321	74
4.1.2	CD-20 Antikörper Rituximab	78
4.1.3	Kombinationswirkung.....	80
4.2	VERÄNDERUNGEN IM STOFFWECHSEL ALS ERKLÄRUNG FÜR DIE PROLIFERATIONSHemmung.....	81
4.2.1	Erklären Zellzyklusveränderungen und Apoptoseinduktion die beobachtete Proliferationshemmung?	81
4.2.2	Erklärt Autophagie die beobachtete Proliferationshemmung?	83
4.3	VERÄNDERUNGEN IN DEN SIGNALWEGEN ALS ERKLÄRUNG FÜR DIE PROLIFERATIONSHemmung	83
4.3.1	Erklären Auswirkungen auf Schlüsselproteine die beobachtete Proliferationshemmung? ..	84
4.3.2	Erklären Auswirkungen auf die cap-abhängige mRNA-Translation die beobachtete Proliferationshemmung?	85
4.4	AUSBLICK.....	89
	LITERATURVERZEICHNIS.....	90
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	98
	LEBENS LAUF	99
	DANKSAGUNG	100

Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	eIF4E-binding protein 1
A20	siehe unter TNFAIP3
A	Ampere
aaPI	altersadaptierter Internationaler Prognostischer Index
Ab	Antikörper (Antibody)
ABC	activated B-cell-like
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
AKT	Proteinkinase B
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser (Aqua destillata)
ASH	American Society of Hematology
A-Stelle	Amnioacyl-Stelle
ATCC	American Tissue Culture Collection
ATG	autophagy related protein
ATP	Adenosintriphosphat
AUG	Adenin, Uracil, Guanin
Bad	BCL-2 antagonist of cell death
Bak	BCL-2 homologous antagonist killer
Bax	BCL-2 associated X protein
BCA	Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid)
BCL-2/3/6	B-cell lymphoma 2/3/6
BCL-X _L	BCL-2 related protein long isoform
BCR	B-Zell-Rezeptor
BIM	BCL-2 like protein 11
BRAF	b-Raf proto-oncogene
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BTK	Burton-Tyrosinkinase
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
CARD11	caspase recruitment domain-containing protein 11
Caspase	Cysteine-dependent aspartate specific protease
CD	cluster of differentiation
CDC25A, 25C	cell division cycle 25A, 25C
CDK	cyclin dependent kinase
CDKN1,1A,1B	cyclin dependent kinase inhibitor 1,1A,1B
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin (Oncovin®), Prednison
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
c-MET	c-mesenchymal-epidermal Transition
c-Myc	avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu ⁺	Kupfer (I)-Ionen
Cu ²⁺	Kupfer (II)-Ionen
DAG	Diacylglycerol
DEPTOR	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DLBCL	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSHNHL	Deutsche Studiengruppe hochmaligne Non-Hodgkin Lymphome
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemilumineszenzreaktion (enhanced Chemilumineszenz)
ECOG-PS	Eastern Cooperative Oncology Group - Group Performance Status
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
eIF-	eukaryotic translation initiation factor -
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal regulated kinase (ERK1/2 = p44/42)
E-Stelle	Exit-Stelle
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting)
FBS	fetales Kälberserum (fetale bovine serum)
FDA	Food and Drug Administration
FKBP-12	FK506-binding protein 12
FLT-3	Fms-like tyrosine kinase 3
FOXP1	forkhead box protein P1
g	Gramm
G ₁ -Phase	Gap ₁ -Phase
G ₂ -Phase	Gap ₂ -Phase
GCB	germinal center B-cell-like
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GSK3 β	Gylogen synthase kinase 3 β
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HCl	Chlorwasserstoff
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2, erb-B2, c-erb-B2
HIF-1	hypoxia inducing factor 1
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
Ig	Immunglobulin
I- κ B	Inhibitor of Kappa B
IKK $\alpha/\beta/\gamma$	I κ B-Kinase $\alpha/\beta/\gamma$
IL-1/-3/-6/-7/-10	Interleukin 1,3,6,7,10
IMDM	Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium
ING1	inhibitor of growth 1
INK4a/ARF	inhibitor of CDK4a/alternate reading frame protein
IP ₃	Inositol-3,4,5-Trisphosphat
IPI	Internationaler Prognostischer Index
IRAK1/4	interleukin-1 receptor-associated kinase 1/4
IRF4	interferon regulatory factor 4
i.v.	intravenös
JAK	Januskinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
l	Liter

Lc3	Light Chain 3
LDH	Laktatdehydrogenase
LMO2	LIM domain only 2
µg	Microgramm
µl	Microliter
m ⁷ GpppN	methyliertes Guanin-Nukleotid
m ⁷ GTP	7-methyl Guanosintriphosphat
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	myeloid cell leukaemia sequence 1
MDM2	Mouse double minute 2
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mLST8/GβL	mammalian lethal-with-sec-thirteen 8/ G-protein β-subunit like protein
MM	Multiples Myelom
mRNA	messenger RNA
mSIN1	mammalian stress-activated protein kinase-interacting protein 1
mTOR	mammalian target of Rapamycin
mTORC1+2	mammalian target of Rapamycin Komplex 1+2
MTT	1-Methyl-1H-Tetrazol-5-Thiol
MUM1	Multiple Myeloma 1
MYD88	myeloid differentiation primary response 88
n.e.	nicht erreicht
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NIK	NF- κB-induzierenden Kinase
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NOS	not otherwise specified
Noxa	abgeleitet vom lateinischen Wort für Schaden
p-	Phospho-
PABP	Poly(A)-bindendes Protein
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte isotone Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PBS-T	PBS / 0,05% (v/v) Tween 20
PCNSL	primäres DLBCL des zentralen Nervensystems
PDK1	PI3-abhängige Kinase 1
PH	pleckstrin homology
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIM	proviral integration site for Moloney murine leukemia virus
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-1,4,5-triphosphat
PKCβ	Proteinkinase C beta
PRAS40	proline-rich AKT substrate 40 kDa
PRDM1	PR domain containing 1, with ZNF domain
PROTOR	protein observed with RICTOR
P-Stelle	Peptidyl-Stelle
PTEN	phosphatase and tensin homologue

Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDV	Polyvinylidenfluorid
RAPTOR	regulatory associated protein of mTOR
R-CHOP	Rituximab - Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin (Oncovin®), Prednison
RICTOR	rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
rpm	rotations per minute
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RUNX	Runt-related
S6K1	S6 Kinase 1
S6RP	S6 ribosomal protein
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SPIB	Spi-B transcription factor
S-Phase	Synthese-Phase
STAT	signal transducer and activator of transcription
TCF/LEF	t-cell specific transcription factor/lymphoid enhancer binding factor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-1,2-diamin
TNFAIP3 (auch A20 genannt)	Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3
TP73	tumor protein p73
TRAF6	Tumor necrosis receptor associated factor 6
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkA	transforming tyrosine kinase protein
tRNA _i ^{Met}	Methionin-Initiator-Aminoacyl-Transfer-RNA
TSC1/2	Tuberous Sclerosis Complex 1/2
UV	ultraviolett
V	Volt
Watt	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)
XBP-1	X-box binding protein 1

Zusammenfassung

Das diffuse großzellige B-Zell- Lymphom (DLBCL) stellt das häufigste auftretende Non-Hodgkin Lymphom dar. Es zählt zu den hochmalignen Lymphomen und lässt sich durch Genexpressionsanalysen in Subgruppen mit unterschiedlichen Prognosen einteilen. Die Frage nach dem unterschiedliche Therapieansprechen zwischen den DLBCL-Untergruppen activated B-cell-like (ABC) und germinal center B-cell-like (GCB) ist trotz weitreichender Forschung noch nicht vollständig geklärt.

PIM-Inhibitoren zeigen bei hämatologischen Erkrankungen vielversprechende Ergebnisse. Mit dem Einsatz von LGB321, einem PIM-Inhibitor, sollen diese bei DLBCL untersucht werden. RAD001, ein mTOR-Inhibitor, wird bereits in Studien bei DLBCL eingesetzt und Rituximab, ein anti-CD20-Antikörper, ist ein etablierter Vertreter der Immuntherapie bei DLBCL.

DLBCL-Zelllinien beider Untergruppen sowie primäre Zellen eines Patienten mit DLBCL wurden mit LGB321, RAD001 und Rituximab einzeln und in Kombination behandelt. Eine Gemeinsamkeit der dabei untersuchten Signalwegkaskaden ist ihr Einfluss auf den Translationsinitiationskomplex eIF-4F und hierüber die Regulation der cap-abhängigen mRNA-Translation. Die gleichzeitige Hemmung verschiedener Signalwege, die eine gemeinsame Endstrecke haben und darüber die Translationsinitiationskomplexbildung vermindern könnten, steigert möglicherweise die Effekte einer Einzelinhibition. Das Erliegen der cap-abhängigen mRNA-Translation könnte induziert werden und somit Verhinderung von Tumorwachstum.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PIM-Inhibitoren zu einer Proliferationsinhibition führen. Durch die Kombination des PIM-Inhibitors mit RAD001 und Rituximab ließen sich in Zellproliferationsassays verstärkte Inhibitionseffekte sowohl bei Zelllinien als auch bei primären Zellen zeigen.

Auf der Suche nach den beteiligten Mechanismen wurden eine ABC-Zelllinie, Riva, und eine GCB-Zelllinie, SU-DHL4, auf Zellzyklusveränderungen, Autophagie und vermehrte Apoptose untersucht.

Die Kombination führte bei beiden Zelllinien zu einem Anstieg der toten Zellen und bei SU-DHL4 zusätzlich zu einem Zellzyklusarrest in der G₁-Phase. Die behandelten Zellen zeigten hingegen keine Zunahme der Autophagie. Bei Riva ließ sich, eingeleitet über Caspase 9, eine Apoptoseinduktion bei der Behandlung mit den Substanzen

nachweisen. Die Apoptoseinduktion wurde auch bei SU-DHL4 sichtbar, jedoch zeigte sich hier eine Abhängigkeit in Bezug auf den Einsatz von Rituximab.

In beiden Zelllinien induzierte die Dreifachkombination eine Herunterregulation des Schlüsselproteins der drei untersuchten Signalwegkaskaden, p-4EB-P1. Unter der Arbeitshypothese, dass hierdurch die Komplexbildung des weiter distal liegenden eIF-4F verhindert werden kann, erfolgte dessen Analyse. Durch den gemeinsamen Einsatz von LGB321 und RAD001 konnte die Komplexbildung gehemmt werden, einen Vorteil durch die Hinzugabe von Rituximab ergab sich nicht. Als Indikator für Auswirkungen auf die cap-abhängige mRNA-Translation zeigte sich eine durch die Dreifachkombination in beiden Zelllinien induzierte verminderte Expression von Mcl-1 und c-Myc.

Diese Erkenntnisse könnten als Grundlage für weiterführende Analysen mit Kombinationstherapien zur Herunterregulation der cap-abhängigen mRNA-Translation als Behandlungsansatz bei DLBCL dienen.

Abstract

Diffuse large B-cell lymphoma is the most frequently occurring non-Hodgkin's lymphoma. It's a high-grade lymphoma that can be divided into subtypes with distinct prognosis by gene-expression profiling. To date, it remains unclear why the subtypes ABC and GCB respond differently to standard chemotherapy.

PIM inhibitors have provided encouraging results for hematologic malignancies. The capacity of a PIM inhibitor, LGB321, in DLBCL remains to be demonstrated. RAD001, a mTOR inhibitor, has been used in several studies investigating DLBCL. Rituximab, an anti-CD20 antibody, is an established component of immunotherapy in DLBCL.

DLBCL cell lines of both subtypes as well as primary cells of a patient with DLBCL were treated with LGB321, RAD001 and Rituximab as single agents and in combination.

The PI3K/AKT/mTOR-, PIM- and ERK- signaling pathways share molecular targets like the activators of cap dependent mRNA-translation and influence the formation of the translation initiation complex eIF-4F. Hypothetically, combining the three agents cause a stronger suppression of the formation of eIF-4F than a single agent. A combined treatment might induce down-regulation of the cap dependent translation and prevention of cancer progress.

This work revealed that PIM-inhibitors reduced proliferation. Moreover, combining the three agents had a stronger inhibiting effect in both DLBCL cell lines and primary cells. The impact on cell cycle, autophagy and apoptosis induction was further analyzed using a cell line from the ABC subtype (Riva) and from the GCB subtype (SU-DHL4). The triple combination induced an increase in cell death in both cell lines. In SU-DHL4 this was associated with G₁ cell-cycle arrest. No increase of autophagy was observed in either cell line. Riva showed an induction of apoptosis via caspase 9 activation after the triple treatment. The induction of apoptosis was also observed in SU-DHL4, but this was linked to the use of Rituximab.

In both cell lines the combined treatment induced a down-regulation of the key protein of the signaling pathways, p-4EB-P1. When assuming that this reduces the formation of eIF-4E, the complex was analysed subsequently. The formation of eIF-4F was suppressed when combining LGB321 and RAD001, there was no benefit of adding Rituximab. As a possible effect on the cap dependent mRNA-translation the combination induced a reduced expression of Mcl-1 and c-Myc in both cell lines. This might be a reason why there should be more studies with combined therapies regarding

the down-regulation of the cap dependent translation as a therapeutic approach for treating DLBCL.

1 Einleitung

1.1 Das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom

1.1.1 Epidemiologie

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) bilden eine Gruppe von malignen Lymphomen, die sich aus B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen, also aus Zellen des lymphatischen Systems, entwickeln. Laut einer Statistik der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. lag die Anzahl der Neuerkrankungen an NHL 2012 bei 16 000 Personen [1]. 5-10 % aller NHL sind T-Zelllymphome und 90-95 % gehören zu den B-Zelllymphomen [2]. B-Zell-Non-Hodgkin Lymphome werden unterteilt in indolente Lymphome und aggressive Lymphome. Das diffuse großzellige B-Zelllymphom (DLBCL) ist mit 30 - 40 % das häufigste aggressive B-Zelllymphom [2,3]. Die Inzidenz liegt bei sieben Fällen pro 100 000 Einwohnern pro Jahr [2]. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 70 Jahre [1,4]. Männer sind häufiger betroffen als Frauen [5].

1.1.2 Klinik

Aufgrund ihrer Heterogenität verursachen DLBCL verschiedene klinische Krankheitsbilder. Meist steht eine rasch progrediente, schmerzlose Lymphadenopathie im Vordergrund [6]. Patienten zeigen in nur 20% der Fälle Allgemeinsymptome, wie zum Beispiel eine B-Symptomatik [6]. Eine extranodale Manifestation liegt bei bis zu 40% der Patienten vor [7].

1.1.3 Klassifikation und Stadieneinteilung

Nach der überarbeiteten Klassifikation der World Health Organisation (WHO) aus dem Jahr 2016 werden DLBCL anhand morphologischer Kriterien der Gruppe der reifen lymphatischen B-Zell-Neoplasien zugeteilt [8]. Zusätzlich bezieht die Einteilung der WHO noch den Immunphänotyp mit ein [8]. Das DLBCL stellt eine eigenständige Gruppe der aggressiven B-Zelllymphome dar [8,9,10]. DLBCL entstehen aus reifen B-Zellen [8]. Je nach Differenzierungsstufe handelt es sich hierbei hauptsächlich um Zentroblasten und Immunoblasten, kleine Anteile machen anaplastische Zellen, Histiocyten oder auch T-Zellen aus [9]. DLBCL weisen ein diffuses Wachstumsmuster auf und haben Zellkerne, die mehr als doppelt so groß sind wie die normaler Lymphozyten [7].

Die Stadieneinteilung bei DLBCL erfolgt, wie bei allen NHL, nach der Ann-Arbor-Klassifikation [11]. Mittels Anamnese, körperlicher Untersuchung, Computertomographie mit Kontrastmittel von Hals, Thorax und Abdomen und einer Knochenmarkbiopsie wird der Lymphknotenbefall sowie die extranodale Lokalisation der tumor betroffenen Areale bestimmt und den Stadien I bis IV zugeordnet [11, 12]. Die Prognose wird mit Hilfe des Internationalen Prognostischen Index (IPI) abgeschätzt [13]. Durch den IPI ist auch eine der Prognose angepasste Therapie möglich. Die deutsche Studiengruppe hochmaligne Non Hodgkin Lymphome (DSHNHL) bietet dem Risikoprofil entsprechende Studien an [14]. Für jede der folgenden zutreffenden Aussagen wird zur Ermittlung des IPI ein Punkt vergeben [13]:

- Alter > 60 Jahre
- Stadium III oder IV der Ann-Arbor-Klassifikation
- Befall > 2 extranodaler Organe
- schlechter Allgemeinzustand (Karnofsky-Index $\leq 70\%$ bzw. Eastern Cooperative Oncology Group - Group Performance Status (ECOG-PS) - Score ≥ 2)
- erhöhte Laktatdehydrogenase (LDH) - Konzentration im Serum

Anhand der ermittelten Punktzahl werden vier Risikogruppen unterschieden:

- 0-1 Punkt: niedriges Risiko mit einem Fünf-Jahres-Überleben von 75%,
- 2 Punkte: niedrig-intermediäres Risiko, Fünf-Jahres-Überleben 50%,
- 3 Punkte: hoch-intermediäres Risiko, Fünf-Jahres-Überleben 43%,
- 4-5 Punkte: hohes Risiko, Fünf-Jahres-Überleben 26% [15, 16].

Beim altersadaptierten International Prognostic Index (aaIPI) werden Patienten anhand ihres Alters (≤ 60 Jahre oder ≥ 60 Jahre), dem Stadium III oder IV, erhöhter Serum-LDH-Aktivität und dem ECOG-PS ≥ 2 in vier Risikogruppen eingeteilt [15]. Es zeigt sich ein deutlich schlechteres Fünf-Jahresüberleben bei den Patienten über 60 Jahre [15].

Dies kommt unter anderem durch die Intensität der Primär- und Rezidivtherapie zustande. Weitere vom IPI unabhängige Risikofaktoren sind eine mehr als 7,5 cm messende Lymphommanifestation [17], die zytomorphologische Variante des DLBCL - bei der zentroblastische Variante zeigen sich bessere Behandlungsergebnisse als bei der immunoblastischen Variante [18] - und ein ungünstiges Genexpressionsprofil [19].

1.1.4 Subgruppen beim DLBCL

Anhand verschiedener Einteilungskriterien lässt sich das sehr heterogene Erkrankungsbild DLBCL in Subgruppen teilen. Unterschiede liegen in der Morphologie

mit 80% zentroblastischem Zellanteil, 10% immunoblastischem Zellanteil und 10 % anaplastischem Zellanteil [9], im Immunphänotyp mit der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle [20,21], in der Zytogenetik mit balancierten Translokationen, Rearrangements oder Zugewinnen [20,21] und in der Genexpression [3,19]. Diese Kriterien können aber nicht auf alle DLBCL angewandt werden. Eine große Gruppe an DLBCL lassen sich nicht unterteilen und werden deshalb in der WHO Klassifikation von 2016 DLBCL not otherwise specified (NOS) genannt [8].

Durch die Genexpressionsanalyse konnten zwei dominierende molekulare Subtypen identifiziert werden: der germinal center B-cell-like-Subtyp (GCB-Subtyp) und der activated B-cell-like-Subtyp (ABC-Subtyp) [19]. Die Subtypen unterscheiden sich in der Expression ihrer Gene (siehe Tabelle 1) und gehen aus unterschiedlichen *cell of origin*, das heißt B-Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien, hervor [19]. Somit unterscheiden sich die Subtypen auch in ihrer Klinik, ihrem Ansprechen auf Chemotherapie und in ihrer Prognose [19,20,21].

Tabelle 1: Unterschiede zwischen den Subtypen ABC und GCB modifiziert nach [22,23,24]

Genetische Aberration und Auswirkung	ABC-DLBCL (%)	GBC-DLBCL (%)
<u>Inhibition der Apoptose durch:</u>		
BCL- 6 Mutation	44	74
BCL-2 Translokation	0	45
MDM2 Amplifikation	0	12
BCL-2 Amplifikation	47	16
Mcl -1 Amplifikation	25	12
BCL-6 Translokation	24	10
<u>Dysregulation des PI3K-Akt-Signalwegs durch:</u>		
Verlust von PTEN	14	55
miR-17-91-Lokus Amplifikation	0	13
PTEN Deletion	0	15
<u>Blockade der Plasmazelldifferenzierung durch:</u>		
PRDM1 Mutation	25	0
SPIB Amplifikation	26	3
<u>Konstitutive Aktivierung des NF-κK – Signalwegs durch:</u>		
CD79B Mutation	21	3
CARD11 Mutation	10	4
MYD88 Mutation	30	1
A20 Mutation	24	2
A20 Deletion	30	22
NFKBIZ Amplifikation	10	0

Auch anhand des klinischen Erscheinungsbildes lassen sich aggressive B-Zelllymphome in verschiedene Subtypen einteilen. Primär mediastinale B-Zell Lymphome (PMBL) treten vor allem bei jungen Frauen auf [7]. Sie haben ihren

Ursprung im Mediastinum, enthalten oft Reste des Thymus und weisen einige klinische und morphologische Gemeinsamkeiten mit nodulärsklerosierenden Hodgkin Lymphomen auf [7]. Zu den seltenen aggressiven B-Zelllymphomen zählen unter anderem intravaskuläre großzellige B-Zell-Lymphome mit einer Manifestation an Haut, Nieren, Lunge und zentralem Nervensystem, das primäre Körperhöhlenlymphom, das häufig extranodal vorkommende plasmablastische Lymphom und das primäre DLBCL des zentralen Nervensystems (PCNSL) [7].

1.1.4.1 germinal center B-cell-like-Subtyp

GCB-artige DLBCL exprimieren Gene und Oberflächenproteine wie Keimzentrums-B-Zellen [19] und sind gekennzeichnet durch den Keimzentrumsmarker CD10 [19]. 74% der GCB weisen den für normale Keimzentrum-B-Zellen typischen transkriptionalen Repressor B-cell lymphoma 6 (BCL-6) und das Protein LIM domain only 2 (LMO2) auf [3,19]. Durch die Expression von BCL-6 kommt es zur Unterdrückung von p53, einem Zellzyklusregulator [25]. p53 stoppt normalerweise den Zellzyklus und induziert Apoptose, sofern sich irreparable Fehler auf der DNA befinden [25]. Der Funktionsverlust begünstigt die Tumorentstehung. Ein weiterer Hinweis, dass GCB von Keimzentrum-B-Zellen abstammen, ergibt sich aus der Expression des Enzyms activation-induced cytidine deaminase (AID) [26]. AID wird in Keimzentrum-B-Zellen stark exprimiert und sorgt für eine somatische Hypermutation der variablen schweren Kette der Immunglobulingene [26]. Auch GCB-artige DLBCL durchlaufen den Immunglobulin G (IgG)-Klassenwechsel [19].

Bedeutend für den GCB-Subtyp ist die Inhibition der Apoptose. Bei 45% der Fälle liegt eine t(14;18) (q32;q21) Translokation vor, wodurch das antiapoptotische BCL-2 auf das Chromosom 14 transloziert wird und unter die regulatorische Kontrolle des IgH-Promoters gerät [3]. Das führt zu einer konstitutiven Aktivierung des antiapoptotischen BCL-2-Gens [3,21]. Außerdem haben Veränderungen an der Aktivität von p53 in Form von konstitutiv exprimiertem BCL-6 [25], p53-Mutationen [3] oder auch eine Zunahme des p53-Antagonisten [27] Auswirkungen an der Induktion der Apoptose. In 12% der Fälle wird durch eine Amplifikation des negativen Regulators von p53, dem Onkogen Mouse double minute 2 (MDM2) die Funktion von p53 verhindert [27].

GCB-artige DLBCL zeichnen sich weiterhin durch Veränderungen im Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg aus [27]. Diese führen zu einer Aktivierung von AKT und mammalian target of rapamycin (mTOR) und fördern somit

Zellüberleben, Proliferation und Wachstum. Gründe liegen bei 55% im Verlust des Antagonisten phosphatase and tensin homologue (PTEN) [28], bei 13% in der Amplifikation des miR-17-92-Lokus, was zur Suppression der Synthese von PTEN führt [27] oder bei 11% der Fälle in der Herunterregulation von PTEN durch heterozygoten Deletion von PTEN [27]. Außerdem lassen sich bei einem Teil der Patienten eine Deletion der Tumorsuppressorgene tumor protein p73 (TP73) und inhibitor of growth 1 (ING1) nachweisen [3]. Dies führt zu genomischer Instabilität [3]. Das progressionsfreie Drei-Jahres-Überleben der GCB nach Standardtherapie lag in einer retrospektiven Analyse bei 74% [20].

1.1.4.2 activated B-cell-like-Subtyp

Der ABC-Subtyp ähnelt bezüglich der differentiell exprimierten Gene aktivierten B-Zellen [19]. Diese B-Zellen befinden sich in der Differenzierung zu Plasmazellen [19]. Der ABC-Subtyp exprimiert Gene wie X-box binding protein 1 (XBP-1), die die Ausdifferenzierung zu Plasmazellen unterstützen [29]. In 25% der Fälle wird die vollständige Differenzierung zu Plasmazellen durch PR domain containing 1 (PRDM1)-Mutation [30], in 24% der Fälle durch BCL-6-Translokation [23] und in 26% der Fälle durch Spi-B transcription factor (SPIB)-Amplifikation [27] aber verhindert.

Das wichtigste Charakteristikum dieses Subtyps ist eine konstitutive Aktivierung des Nuclear factor κ B (NF- κ B) - Signalwegs, welcher zu Zellüberleben und Proliferation führt und Apoptose verhindert [20,31]. NF- κ B ist eine komplexe Transkriptionsfaktorfamilie. NF- κ B spielt unter anderem eine äußerst wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems bei der Immunantwort und ist bei der Steuerung von proliferationsfördernden Zytokinen wie Interleukin 6 (IL-6) oder Interleukin 10 (IL-10) und antiapoptotischen Prozessen von Bedeutung [32,33]. Die Besonderheit dieses Signalwegs bei ABC-DLBCL liegt darin, dass NF- κ B hier signalunabhängig, konstitutiv aktiv vorliegt und somit auch eine Beendigung über den Inhibitor of kappa B (I- κ B) nicht möglich ist [20,31]. I- κ B, eine Untereinheit des NF- κ B-Komplexes, hemmt normalerweise nukleäre Lokalisationssignale von NF- κ B und verhindert so den aktiven Transport des Transkriptionsfaktors über einen Kernporenkomplex in den Zellkern [34]. Beim ABC-Subtyp wird NF- κ B fortlaufend in den Zellkern transportiert [31]. Verantwortlich hierfür sind eine Reihe aktivierender Mutationen und Läsionen (siehe Abbildung 1). Diese liegen in einem Teil des B-Zell-Rezeptors (BCR), dem cluster of differentiation 79 (CD79) [24], bei dem zytoplasmatischen Gerüstprotein caspase

recruitment domain protein 11 (CARD11) [22,27] oder bei myeloid differentiation primary response 88 (MYD88) [35].

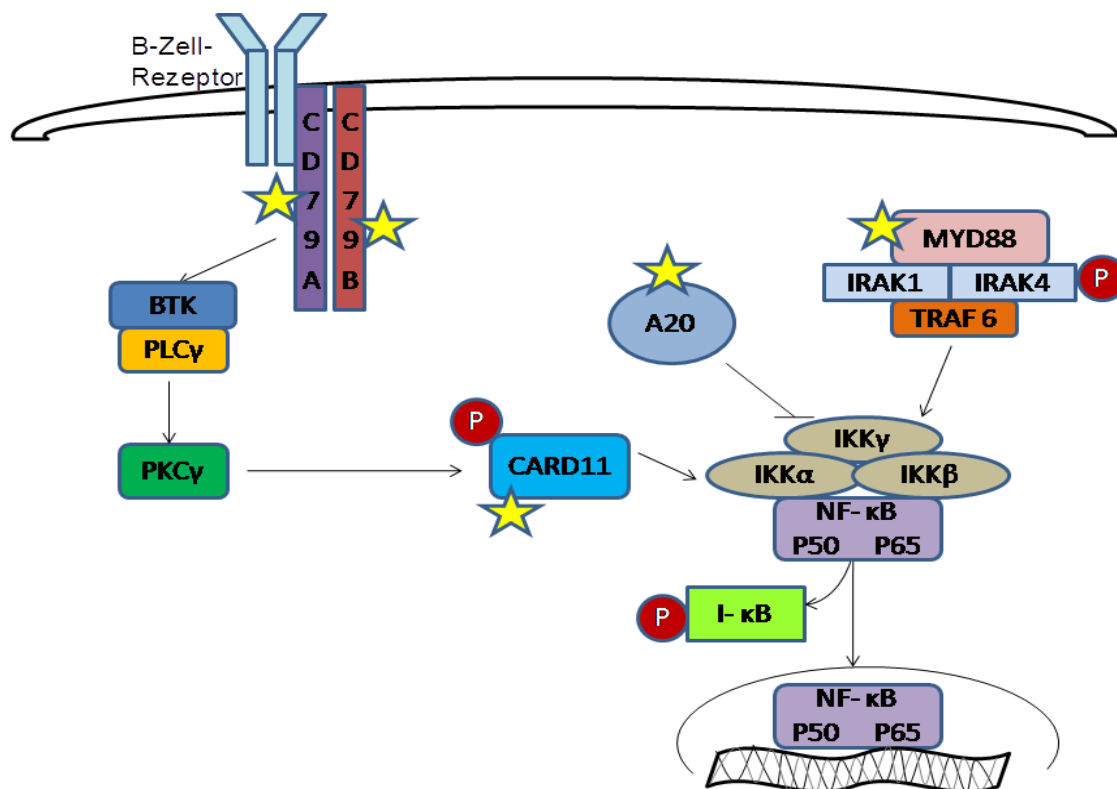


Abbildung 1: Konstitutive Aktivierung des NF-κB – Signalwegs in ABC-DLBCL modifiziert nach [22,24,36] Dargestellt sind verschiedene im ABC-Subtyp vorkommende Mutationen, die jeweils zu einer Aktivierung des NF-κB – Signalwegs führen. Der BCR, ein Transmembranprotein, besteht aus einem membrangebundenem Immunglobulin und einem zytosolisch liegenden Teil. Der zytosolische Teil ist mit dem Heterodimer CD79A und CD79B nicht kovalent verbunden [24]. Mutationen in CD79A und CD79B sorgen für eine vermehrte Expression des BCR auf der Zelloberfläche und reduzieren die Feedback-Hemmung von CD79A und CD79B auf den BCR [24]. Somit kommt es über eine chronische Aktivierung des nachfolgenden Signalwegs auch zur vermehrten Aktivierung von NF-κB [24]. CD79A und CD79B sind für die intrazelluläre Signalweiterleitung über die Aktivierung der Burton-Tyrosinkinase (BTK) verantwortlich [24]. Über Phospholipase C γ (PLCγ) wird Phosphatidylinositol-4,5- Biphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-3,4,5-Trisphosphat (IP₃) hydrolysiert. PIP₂, DAG und IP₃ wirken als sekundäre Botenstoffe in der Zelle. DAG führt über die Proteinkinase C β (PKCβ) und die anschließende Phosphorylierung des zytosolischen Gerüstprotein CARD11 zu einer Aktivierung von NF-κB über den klassischen Signalweg [22,27]. Mutationen in CARD11 bewirken eine Konformationsänderung des Gerüstproteins [22,27]. Hierdurch kommt es zu einer Bindung und Phosphorylierung an IKKβ und zur Aktivierung des klassischen NF-κB – Signalwegs [22,27]. Mutationen in MYD88 führen in der Zelle zu einer verstärkten Komplexbildung mit interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), IRAK4 und Tumor necrosis receptor associated factor 6 (TRAF6) [35,36]. Der gebildete Komplex aktiviert den NF-κB-Signalweg. NF-κB liegt als Komplex, bestehend aus 2 Untereinheiten, dem I-κB-Kinase (IKK) - Komplex aus IKKα, IKKβ und IKKγ, diese Untereinheit wird auch NEMO genannt, und einem Heterodimer der Proteine p50 und p65 im Zytoplasma vor [34]. Wird der Signalweg durch einen NF-κB-aktivierenden Stimulus angeregt, kommt es zur Phosphorylierung von I-κB und somit zu dessen proteasomalen Degradation [34]. Die NF-κB-Heterodimere p50/p65 werden aus dem Komplex freigesetzt, wandern in den Zellkern und wirken als Transkriptionsfaktoren [34]. Durch die Deletion des Inhibitors des Signalwegs, A20, wird die Deubiquitinierung der regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes, IKKγ, gestört [31,36]. Durch die inaktivierende Mutation von A20 kann einer Aktivierung des Signalwegs nun nichts entgegen gesetzt werden [31,36]. →Aktivierung; -Hemmung; *Mutation

Bei ABC sind in 3% bzw. 21% der Fälle Mutationen in CD79A bzw. CD79B nachweisbar [24,31]. Diese Mutationen führen zu einer erhöhten Expression des BCR auf der

Zelloberfläche und resultieren in einer chronischen Aktivierung des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs [24]. Ebenso wird der Gegenspieler des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs, die LYN Kinase, vermindert aktiviert [24]. In 10% aller ABC sind aktivierende Mutationen in CARD11 nachweisbar [22,31]. 30% der ABC-DLBCL weisen eine aktivierende Mutation bei MYD88 auf [31,35]. Hierbei kommt es über die Bildung eines Multiproteinkomplexes zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes und zum Abbau von I- κ B [34]. NF- κ B werden freigesetzt, wandern in den Zellkern und aktivieren die Zielgene [34]. Weiterhin spielt in 30% eine Störung in der Negativregulation des NF- κ B-Signalwegs, A20, auch Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3 (TNFAIP3) genannt, eine wichtige Rolle in der konstitutiven Aktivierung [31,36]. Aufgrund der konstitutiven Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs kommt es beim ABC-Subtyp zu einer Überexpression von NF- κ B-Targetgenen, wie zum Beispiel dem Translationsfaktor interferon regulatory factor 4 (IRF4), welcher deshalb als charakteristisches Merkmal der ABC-DLBCL angesehen wird [20,31].

Weitere Charakteristika, die bei ABC-artigen DLBCL auftauchen können, sind die Deletion des inhibitor of CDK4a/alternate reading frame protein (INK4a/ARF) Tumorsuppressorlokus, was zu genomischer Instabilität führt, die Amplifikation von 18q, was zu einer Überexpression von BCL-2 führt und eine Trisomie 3, die zur Aktivierung von forkhead box protein P1 (FOXP1) führt [3]. Das progressionsfreie Drei-Jahres-Überleben der ABC nach Standardtherapie lag in einer retrospektiven Analyse bei 40% [20].

1.1.5 Therapie

Bei DLBCL ist der primäre Therapieansatz mit einer Chemo- und Immuntherapie kurativ [37]. Heilungsraten liegen bei bis zu 50-90% [37]. Die wohl am häufigsten weltweit zum Einsatz kommende Behandlung ist eine Chemoimmuntherapie aus Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin (Oncovin®) und Prednison (CHOP) [38] in Kombination mit Rituximab (R-CHOP) [39]. In den letzten Jahren hat die Immuntherapie als Behandlungsform bei den B-NHL ganz wesentlich an Bedeutung gewonnen.

Gentechnisch hergestellte Antikörper wie insbesondere Rituximab kommen in großem Ausmaß zum Einsatz [40]. Neben Rituximab gibt es weitere gegen CD20 gerichtete Antikörper wie Ofatumumab und Obinutuzumab [41]. Darüber hinaus sind Antikörper gegen weitere Oberflächenantigene wie CD19 gegenwärtig in der klinischen Prüfung (Studiennummern NCT02763319 und NCT02399085) [42,43]. Des Weiteren gibt es

Studien, in denen für Patienten mit einem GBC bzw. ABC Subtyp unterschiedliche Behandlungsregime gewählt werden und so gezielt Subtypen-spezifische Therapien analysiert werden. Allerdings hat die Genexpressionsanalyse zur Bestimmung der beiden DLBCL Subtypen noch keinen Eingang in die Routinetherapie gefunden. Ein Argument gegen einen Einsatz der Genexpressionsanalyse in der Routinetherapie ist, dass Studien, die gezielt unterschiedliche Behandlungsregime für ABC und GCB untersuchen, keinen prognostischen Unterschied zwischen den Subtypen nachweisen konnten. Prospektiven Phase III - Studien, in denen zusätzlich zur Standardtherapie Brotezomib eingesetzt wurde [44], ein Antikörper mit einem hemmenden Einfluss auf den bei ABC aktivierten NF- κ B-Signalweg, ergaben interessanterweise im Gegensatz zu retrospektiven Analysen bisher nicht, dass ABC Lymphome prognostisch ungünstiger verlaufen als GCB Lymphome [44]. Diese Ergebnisse können jedoch aufgrund eines systematischen Studienfehlers (*bias*) durch den schlechteren Krankheitsverlauf von Patienten mit ABC Lymphomen bedingt sein [45]. Aufgrund des zum Teil sehr reduzierten Allgemeinzustands von Patienten mit ABC Lymphomen erreichen sie möglicherweise die Teilnahme an Studien nicht, da sie eine sofortige Therapie benötigen und nicht warten können bis alle für die Studienteilnahme notwendigen Untersuchungen abgeschlossen wurden [45]. Somit gelangen nur die Patienten mit besser verlaufenden ABC Lymphome in die Studien, während alle Patienten mit GCB Lymphomen, bedingt durch ihren besseren Allgemeinzustand, teilnehmen können. Weitere Studien versuchen im Moment mit Substanzen wie Lenalidomid, als Inhibitor des NF- κ B –Signalweges, oder Ibrutinib, als BTK-Inhibitor, den Therapieerfolg bei ABC-DLBCL zu verbessern [46]. Alternativ wird von einigen Gruppen mit Hilfe der Immunhistologie durch den Einsatz von Antikörpern gegen CD10, BCL-6 und IRF4/Multiple Myeloma 1 (MUM1) ein GCB- von einem sogenannten non-GCB-Typ unterschieden. Meist wird hierbei der sogenannte Hans-Classifier eingesetzt [47]. Eine Subtypisierung mittels Immunhistochemie etwa durch den Hans-Classifier ist jedoch umstritten, weil die Ergebnisse sich nicht vollständig mit den Resultaten der Genexpressionsanalysen decken.

1.1.5.1 CD20 Antikörper Rituximab

Mitte der 70er Jahre gelang der Arbeitsgruppe um César Milstein und George Köhler mittels Hybridomtechnik der Durchbruch in der Herstellung von ausreichenden Mengen an therapeutischen, monoklonalen Antikörpern [48]. Durch die Markierung der

Oberflächenantigene mit Antikörpern kann sich das Immunsystem gezielt gegen Zellen richten und diese zerstören [48]. Reife B-Lymphozyten exprimieren zum Beispiel die Oberflächenantigene CD19 und CD20 [49]. Diese Oberflächenantigene kommen aber nicht ubiquitär auf anderen lymphatischen Zellen wie Stammzellen oder Plasmazellen vor [49]. Durch diese Besonderheit kann sich die B-Zellpopulation nach dem Absetzen einer Therapie mit monoklonalen Antikörpern wie Rituximab wieder normalisieren [50]. Rituximab ist ein monoklonaler, chimärer, das heißt humanisierter IgG1-Mausantikörper [50]. Er wird aus einer variablen Mausekette und einer konstanten humanen Kette gebildet [50]. Entwickelt wurde der Antikörper 1991, damals noch IDEC-2C8B genannt, durch IDEC Pharmaceuticals (San Diego, USA) und schon 1997 wurde Rituximab von der Food and Drug Administration (FDA) in den USA als erster Antikörper zur Therapie maligner Erkrankungen zugelassen [51].

Rituximab bindet an das CD20-Oberflächenantigen auf B-Zellen, das sowohl auf gesunden B-Lymphozyten als auch an B-Zelllymphomzellen exprimiert wird [50]. Sobald der Antikörper an CD20-positive B-Zellen gebunden hat, kann das eigene Immunsystem gegen die markierte Zelle aktiv werden [50]. Die Wirkung von Rituximab ist trotz des weit verbreiteten Einsatzes noch nicht vollständig geklärt [40]. Rituximab wirkt durch drei unterschiedliche Mechanismen: es kommt zur Komplement-vermittelten Zellyse (CDC), eine antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) wird ausgelöst und Rituximab wirkt hemmend auf den Zellzyklus und fördert Apoptose über direkte inhibitorische Effekte [40]. Studien konnten zeigen, dass die Komplement-vermittelte Lyse durch Rituximab über die Aktivierung des klassischen Wegs durch die Bindung von humanem Komplement C1q an Rituximab erfolgt [40,52]. Es kommt zur Bildung eines Membranangriffkomplexes und Porenbildung in der Zellmembran, welche zur Lyse führt [40,52]. Weiterhin kommt es über die Aktivierung des retikulohistiozytären Systems durch die Bindung von Fc γ -Rezeptor exprimierenden Zellen an den Fc-Teil von Rituximab im Rahmen des ADCC zur Phagozytose und Lyse der Zielzellen [40,53]. Die direkten Wirkungen von Rituximab auf den Zellzyklus und auf die Apoptose entstehen über Membran-assoziierte proximale Ereignisse. So wird zum Beispiel durch Rituximab der Kalzium-Fluss verändert und es kommt zu einer Translokation von CD20 in cholesterinreiche Bereiche, die lipid raft Mikrodomänen [40]. Es entstehen Veränderungen an Signalwegen und an den dadurch kontrollierten Proteinen [40]. Rituximab zeigt bei DLBCL Auswirkungen auf den PI3K/AKT/mTOR - Signalweg, den NF- κ B – Signalweg, den mitogen-activated protein kinase (MAPK) / extracellular signal

regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) - Signalweg und den MAPK/p38 – Signalweg und führt zu einer Chemosensitivierung und Apoptoseinduktion [54,55] (siehe Abbildung 2).

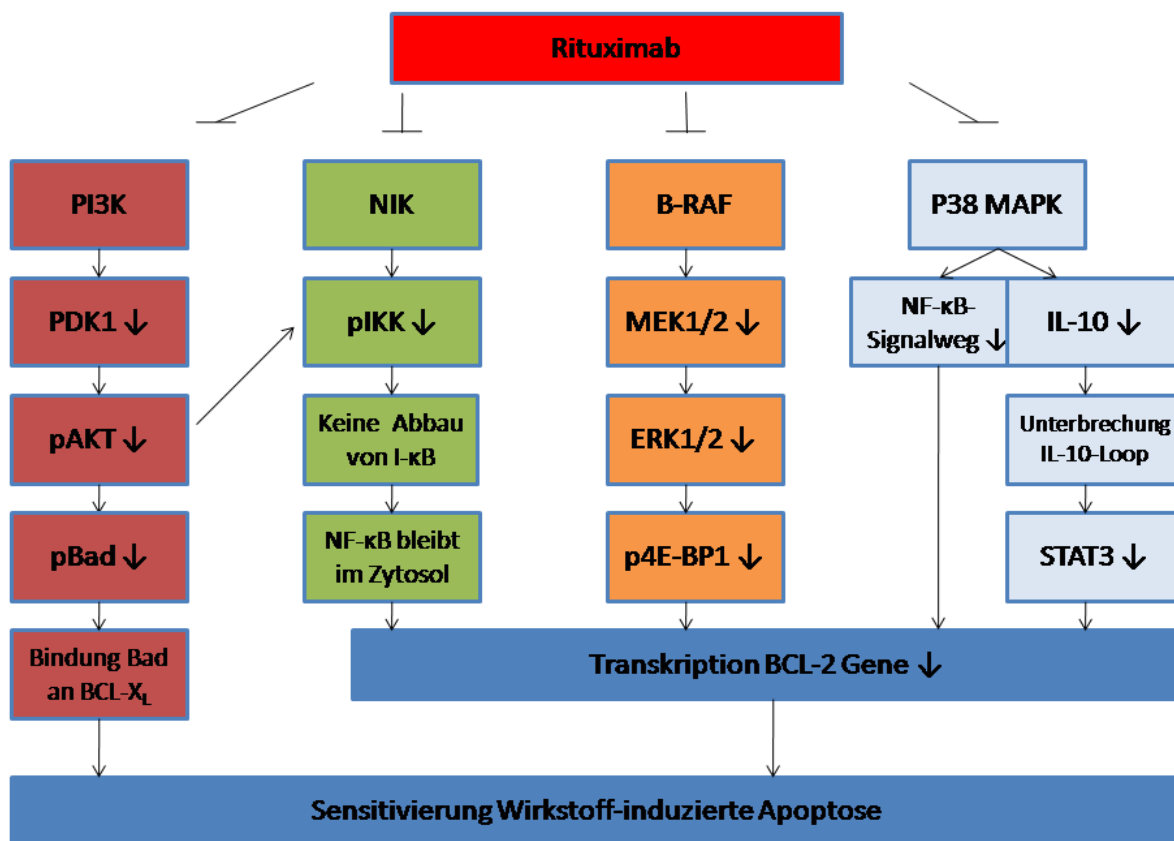


Abbildung 2: Übersicht über die Auswirkungen von Rituximab auf verschiedene Signalwege bei DLBCL modifiziert nach [54,55] Rituximab hemmt PI3K, dies führt zu einer verminderten Aktivierung der PI3-abhängige Kinase 1 (PDK1) und somit auch zu einer verminderten Phosphorylierung und Aktivierung von AKT [55]. Die Phosphorylierung des proapoptotischen Proteins BCL-2 antagonist of cell death (Bad) nimmt ab und eine Bindung von Bad an antiapoptotischem BCL-2 related protein long isoform (BCL-X_L) wird möglich [55]. Außerdem führt die Abnahme an phosphoryliertem und somit aktiviertem AKT zu einer reduzierten Aktivierung des NF-κB – Signalwegs [55]. Desweiteren kommt es durch Rituximab auch direkt zu einer verminderten Aktivierung des NF-κB – Signalwegs [55]. Die NF-κB-induzierenden Kinase (NIK) wird gehemmt [55]. Somit ist eine Phosphorylierung der IKK nicht möglich und es kommt nicht zur proteasomalen Degradation von I-κB [34,55]. NF-κB kann nicht freigesetzt werden, wandert nicht in den Zellkern und Zielgene können nicht aktiviert und transkribiert werden [34,55]. Außerdem hemmt Rituximab die Phosphorylierungskaskade des MAPK-Signalwegs [55]. Über die Inhibition der MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP-3K) B-Raf wird die Aktivität der MAP-Kinase-Kinase (MAP-2K) MEK1/2 verhindert und dadurch auch die Phosphorylierung von ERK1/2 (p44/42) [55]. Es kommt zu einer Hemmung von ERK-vermittelten Signalen z.B. über die Abnahme der Phosphorylierung von Tuberos Sclerosis Complex 2 (TSC2), damit einer verminderte Aktivierung des mTOR-Komplexes 1 (mTORC1) und Abnahme der Phosphorylierung von 4E-BP1 und somit auch zu einer verminderten Expression von Proteinen der BCL-2 Familie wie BCL-2 und BCL-X_L [55], sowie von myeloid cell leukaemia sequence 1 (Mcl-1) [55]. Rituximab vermittelt wandert CD20 in lipid raft Domänen und aktiviert eine Signalkaskade, die zur downstream Inhibition der p38 MAPK führt [55]. Der NF-κB – Signalweg wird nicht aktiviert und es kommt zu einer Hemmung der IL-10 Transkription [55]. Der autokrine-parakrine IL-10-Loop wird unterbrochen, es resultiert eine verminderte Aktivierung des Transkriptionsfaktors signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) und somit eine verminderte Transkription der BCL-2-Gene [55]. →Resultat; ⊥Hemmung

In Deutschland wurde Rituximab Mitte 1998 erstmals zur Alleintherapie gegen chemotherapeutisch unempfindliche oder rezidivierende NHL im Stadium III bis IV

zugelassen [56]. Mittlerweile wird es bei allen B-Zelllymphomen eingesetzt. Bei DLBCL verbesserte die Kombination Rituximab mit CHOP die Rate an komplettem Ansprechen und das Gesamtüberleben [56].

Häufig auftretende Nebenwirkungen bei einer Therapie mit Rituximab sind grippeähnliche Symptome und allergischen Reaktionen [57]. Gefürchtet ist das sehr selten vorkommende Tumorlyse-Syndrom, welches vorallem bei dem Zerfall großer Tumorlast auftritt und bei einigen wenigen Patienten zu einem Multiorganversagen unter der Rituximabtherapie geführt hat [58].

1.2 Das PIM-Signalnetzwerk

Proviral integration site for Moloney murine leukemia virus (PIM)-Kinasen gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen. Der Name leitet sich von einem 1984 in Mäusen entdeckten Genabschnitt ab [59]. Die dortige Integration des verwendeten Moloney murine leukemia virus führt zur Transkription der PIM-Gene und zur Expression der PIM-Kinasen [59]. Es sind drei Isoformen der PIM-Kinasen bekannt, PIM-1, PIM-2 und PIM-3. Von PIM-1 sind zwei Isoformen bekannt, PIM-2 wiederum unterteilt sich nochmal in drei Isoformen [60]. Beim Menschen befindet sich PIM-1 auf dem Chromosom 6p21, PIM-2 auf dem Chromosom Xp11 und PIM-3 liegt auf dem Chromosom 22q [61]. Ein Hinweis auf die onkogene Wirkung der PIM-Kinasen ist ihre Überexpression in vielen malignen Tumoren [61]. Konstitutive PIM-3 Expression kann unter anderem im hepatozellulären Karzionom [62,63], Magenkarzinom, Pankreaskarzinom und im Kolonkarzinom [63,64] nachgewiesen werden. Erhöhte Expression von PIM-1 zeigt sich in Kopf-Hals-Tumoren [65], im Adenokarzinom der Prostata [66], aber auch in hämatologischen Neoplasien [61]. Eine PIM-2 Überexpression lässt sich in hämatologischen Erkrankungen wie Akute myeloische Leukämie (AML), Chronische lymphatische Leukämie (CLL), aber auch im Mantelzell-Lymphom und in DLBCL, insbesondere im ABC-Subtyp, nachweisen [61,67,68]. Diese Tatsache macht die PIM-Kinasen als Angriffspunkt für einen Subtypen-spezifischen Therapieansatz interessant. Die Expression der PIM-Kinasen erfolgt in Lymphozyten über den Januskinase (JAK) – STAT – Signalweg [61] und über die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs [69] (siehe Abbildung 3). PIM-1-Expression wird auf hämatopoetischen Zellen unter anderem durch Wachstumsfaktoren wie Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF), IL-3, IL-6, IL-7 oder Erythropoetin induziert, PIM-2 ist unter anderem ein Zielgen des Transkriptionsfaktors NF- κ B [72].

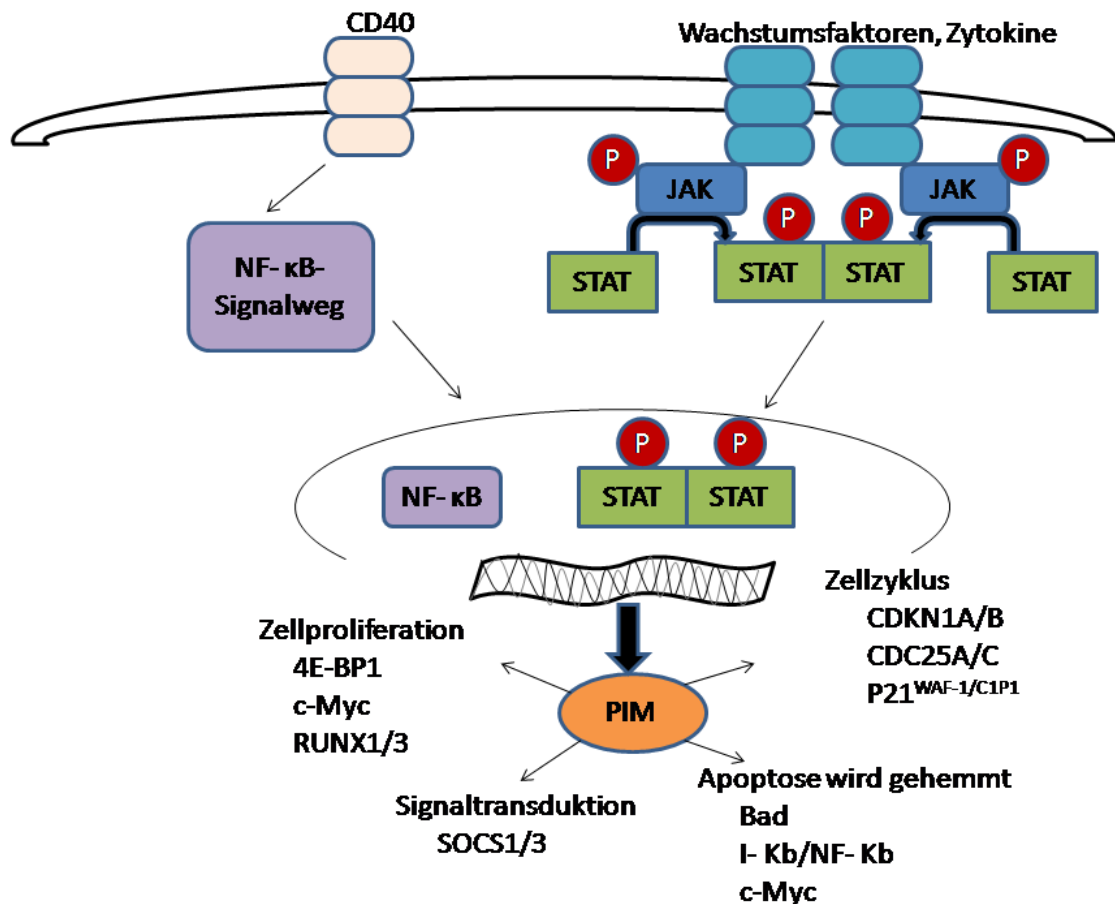


Abbildung 3: Auswirkungen des PIM-Signalwegs bei DLBCL modifiziert nach [61,70,69,71] Die Bindung von Zytokinen an membranständige Rezeptoren führt zur Phosphorylierung der JAK am intrazellulären Teil des Rezeptors. JAK phosphoryliert nun STAT – Proteine, welche anschließend in den Zellkern wandern und als Transkriptionsfaktoren für die PIM-Gene wirken [61,70]. Desweiteren werden PIM-Gene über den NF-κB Signalweg exprimiert. Über die Bindung von CD40 an dessen Rezeptor CD40L kommt es unter anderem zur Aktivierung des NF-κB Signalwegs [69,71]. NF-κB wirkt im Zellkern als Transkriptionsfaktor für PIM-Gene [61]. →Resultat

Reguliert werden die PIM-Kinasen auf der Ebene der Transkription und Translation [61].

Die Inaktivierung der Kinasen erfolgt durch proteosmale Degradation, welche durch Autophosphorylierung gesteuert wird [73].

PIM-Kinasen haben Funktionen inne bei der Regulation der Apoptose, der Transkription, der Translation, des Zellzyklus und der Signaltransduktion [61].

PIM-Kinasen werden als Onkogene angesehen. Antiapoptotisch wirken PIM-Kinasen zum einen durch inaktivierende Phosphorylierung an Serin 112, Serin 136 und Serin 155 des proapoptotischen BCL-2-Familienmitglieds Bad [60]. Apoptotischer Zelltod wird nun durch die Freisetzung der antiapoptotischen Proteine BCL-2 und BCL-X_L gehemmt [61]. Außerdem wirken PIM-Kinasen auf p65, ein Protein eines Heterodimeres, welches als Bestandteil des NF-κB-Komplexes im Zytosol vorliegt [61,69]. Sie regulieren so den I-κB/NF-κB-Transkriptionsfaktor-Komplex. Es kommt zu einer Degradation von I-κB,

NF- κ B wandert in den Zellkern und wirkt als Transkriptionsfaktor für antiapoptotische Proteine [34].

Einfluss auf die Transkription haben PIM-Kinasen vorallem durch ihre Wirkung auf den transkriptionellen Regulator avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog (c-Myc). PIM-Kinasen erhöhen durch die Phosphorylierung an Serin 62 die Stabilität von c-Myc und verhindern so dessen den Abbau [61]. c-Myc, ein Protoonkogen, führt zur Expression von Genen, die für Zellzyklus, Proliferation und Apoptose wichtig sind [74]. Es fördert maligne Transformation bei Überexpression über die Aktivierung proliferationsfördernder Gene und über die gleichzeitige Unterdrückung proliferationshemmender Gene [74]. Über eine Sensibilisierung der Zelle induziert c-Myc durch p53 vermittelt jedoch auch bei gleichzeitigem Fehlen antiapoptotischer Signale Apoptose [74]. PIM-Kinasen unterdrücken den proapoptischen Effekt von c-Myc und hemmen so c-Myc-induzierte Apoptose [61]. Außerdem haben sie Einfluss auf die Transkriptionsfaktoren Runt-related (RUNX) 1 und RUNX3 [61]. RUNX1 wird vor allem auf hämatopoetischen Zellen exprimiert und reguliert die Transkription von Genen für die Myelopoese und für Wachstumsfaktorrezeptoren. RUNX3 hat Funktionen in der neuronalen sowie T-Zell-Entwicklung inne [75].

Auswirkungen auf die Translation haben die PIM-Kinasen über die Veränderungen der Signalwegs-Aktivitäten des mTORC1. Für PIM-2 konnte gezeigt werden, dass es die Aktivität des mTORC1 reguliert [61,76]. Über eine durch PIM-2 vermittelte Phosphorylierung des upstream liegenden negativen Regulators TSC2 an Serin 1798 kommt es zu einer vermehrten Aktivierung von mTORC1 [76]. Desweiteren hemmen PIM – Kinasen den Translationsrepressors eIF-4E-binding-protein (4E-BP1) [61] durch Phosphorylierung an Threonin 37, Threonin 46 und Serin 65. Hierdurch wird eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) freigesetzt und bindet an die cap-Struktur der messenger Ribonukleinsäure (mRNA) [61]. Die cap-abhängige mRNA - Translation von Proto-Onkoproteinen, Angiogenesefaktoren und Wachstumsfaktoren, wie c-Myc und Cyclin D1, beginnt (detaillierter Ausführung siehe Abschnitt 1.4) [77].

Weiterhin wirken PIM-Kinasen auf den Zellzyklus. PIM-1 führt über die Phosphorylierung des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p21^{WAF1/CIP1} zu dessen Stabilisierung [61]. p21^{WAF1/CIP1} interagiert mit allen cyclin dependent kinase (CDK)-Komplexen, sorgt für eine Hemmung ihrer Kinase-Aktivität und damit zu Veränderungen am Zellzyklus in Form von Gap₁ (G₁)- und Synthese (S)-Phasen-Arrest [78]. Außerdem haben PIM-Kinasen Einfluss auf die Regulatoren cyclin dependent kinase inhibitor 1A

(CDKN1A), CDKN1B (auch p27^{KIP1} genannt), cell division cycle 25A (CDC25A) und CDC25C [61].

Über die phosphorylierende Inhibition von suppressor of cytokine signalling 1 (SOCS1) und SOCS3 durch PIM-Kinasen wird die Signaltransduktion beeinflusst. Die Phosphorylierung von SOCS1 und SOCS3 führt zu einer Stabilisierung der JAK-Proteine und somit zur Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs [61].

1.2.1 Die PIM – Inhibitoren SGI-1773, SGI-1776 und LGB321

In Tierversuchen konnte 2004 bei Knock-Out Mäusen für PIM-1, PIM-2 und PIM-3 gezeigt werden, dass die Kinasen nicht lebensnotwendig sind [79]. Die Mäuse wiesen zwar eine stark verringerte Körpergröße auf und reagierten nicht auf hämatologische Wachstumsfaktoren, waren aber fertil und lebensfähig [79].

Es existieren zwei Gruppen von PIM-Inhibitoren, Adenosintriphosphat (ATP)-mimetische Substanzen und ATP-kompetitive Inhibitoren. Inhibitoren der ersten Gruppe passen genau in die ATP-Bindetasche der PIM-Kinase und bilden eine Wasserstoffbindung mit PIM-1. Ein Beispiel ist Staurosporin [80]. Zu den ATP-kompetitiven PIM- Inhibitoren gehören SGI-1773, SG1-1776 und LGB321 [81,82]. SGI-1776 und SGI-1773 sind hoch spezifisch für die Inhibition von PIM-1 und PIM-3 sowie für die membrangebundenen Rezeptortyrosinkinasen Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT-3) und transforming tyrosine kinase protein (TrkA) [81]. Die halbmaximale Hemmkonzentrationen (IC₅₀) bei SGI-1776 für PIM-1, PIM-2 und PIM-3 liegen bei 7, 363 und 69 nmol/l [81], im Vergleich dazu liegen die halbmaximale Hemmkonzentrationen von SGI-1773 für PIM-1 und PIM-2 bei 2 und 43 nmol/l [83]. Dies zeigt, dass die beiden PIM-Inhibitoren für PIM-2 weniger spezifisch sind [81]. Es konnte gezeigt werden, dass SGI-1776 bei hämatologischen Neoplasien bei Konzentrationen zwischen 1 und 10 µmol/l wesentliche Effekte auf Zellproliferation und Zelltod auslöst und Apoptose induziert [81,84]. Phase I - Studien aus den Jahren 2009 und 2010 mit SGI-1776 bei Patienten mit refraktärem oder rezidivierendem NHL, Leukämie oder Prostatakarzinom mussten jedoch aufgrund kardiotoxischer Nebenwirkung mit Verlängerung der QTc-Zeit vorzeitig beendet werden [85,86]. Dem gegenüber gelang es mit LGB321 einen selektiven Inhibitor für alle drei PIM-Kinasen (pan-PIM-Inhibitor) herzustellen [82]. PIM-2 stellt aufgrund seiner, verglichen zu den anderen beiden Kinasen, niedrigen Michaelis-Menten-Konstante für ATP (K_m von 4 µmol/L) eine schwierig zu hemmende Kinase dar [60]. PIM-2 wird aber durch

den Einsatz von LGB321 auch erreicht [82]. Die halbmaximalen Hemmkonzentrationen für LGB321 liegt bei PIM-1 bei 1,0 pmol/L, bei PIM-2 bei 2,1 pmol/L und bei PIM-3 bei 0,8 pmol/L [82]. Untersuchungen zeigten eine starke antiproliferative Wirkung des Inhibitors auf Zelllinien hämatologischer Erkrankungen, wie zum Beispiel Multiples Myelom (MM), Akute lymphatische Leukämie (ALL), AML, CLL und B-NHL [82]. LGB321 inhibiert konzentrationsabhängig die Phosphorylierung von Bad sowie der Proteine S6K und S6 ribosomal protein (S6RP), die downstream von mTORC1 liegen [82]. In klinische Studien wird bereits ein oral verfügbarer pan-PIM-Inhibitor, PIM447, strukturell ähnlich zu LGB321, bei Patienten mit MM angewandt [87].

1.3 Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

Ein für die Zellproliferation, für Stoffwechselprozesse und für Zellzyklusprogression in Krebszellen wichtiger Signalweg ist der seit den 1980ern erforschte PI3K/AKT/mTOR - Signalweg [88,89]. Durch vermehrte Stimulation über Wachstumsfaktoren, durch Mutationen oder auch durch den Funktionsverlust von PTEN, dem Gegenspieler dieses Signalwegs, ergeben sich Veränderungen im Ablauf, die für Krebszellen von großer Bedeutung sind. Auch für DLBCL lässt sich die besondere Rolle dieses Signalwegs nachweisen [90,91].

Die Aktivierung des Signalwegs erfolgt über die Bindung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen am extrazellulären Teil einer transmembranären Rezeptortyrosinkinase oder über G-Protein gekoppelte Rezeptoren [88,89]. Rezeptortyrosinkinasen bestehen aus einem extrazellulären Teil, an dem ein Ligand bindet, einem transmembranären Teil und einem intrazellulären Teil mit katalytischer Aktivität [92]. Die Bindung des Liganden sorgt für eine Dimerisierung und Autophosphorylierung der Tyrosinreste des intrazellulären Teils der Rezeptortyrosinkinase [92]. An die phosphorylierte Stelle des Rezeptors können nun weitere Proteine, wie zum Beispiel PI3K binden [93]. PI3K ist eine in allen eukaryotischen Zellen vorkommende Lipidkinase-Familie. Anhand ihrer Struktur, ihrer Substratspezifität und ihres Aktivierungsmechanismus werden sie in die Gruppen PI3K IA, IB, II und III eingeteilt [93]. Die Klasse IA besteht aus einem Heterodimer, welches aus der regulatorischen Untereinheit p85 und der katalytischen Untereinheit p110 α gebildet wird [93]. Die Bindung von p85 mit p110 α hemmt die Kinaseaktivität [93]. Durch die Aktivierung und Autophosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase kann die regulatorische p85-Untereinheit daran binden und sorgt dafür, dass PI3K in die Nähe des membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-

biphosphat (PIP₂) gelangt [93]. Hierdurch wird dessen Phosphorylierung zu Phosphatidylinositol-1,4,5-triphosphat (PIP₃) katalysiert [94]. Reguliert wird PIP₃ durch die Phosphatase PTEN. PTEN dephosphoryliert PIP₃ und hemmt somit den Ablauf des Signalwegs [88]. Der Second Messenger PIP₃ rekrutiert Proteine mit einer pleckstrin homology-Domäne (PH-Domäne) an die Zellmembran. Hierzu gehört auch AKT. AKT steht synonym für die Gene der Proteinkinase B [95]. Die Proteinkinase B gehört zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen. An der Membran wird AKT durch die Serin/Threonin-Kinase PDK an Threonin 308 und durch mTORC2 an Serin 473 phosphoryliert und damit aktiviert [95]. Aktiviertes AKT hat eine wichtige Rolle beim Zellüberleben, indem es Apoptose verhindert und es fördert Zellproliferation durch die Regulation des Zellzyklus und der Proteinbiosynthese. AKT wirkt über die Phosphorylierung und damit Inaktivierung proapoptotischer Proteine wie Bad, BCL-2 associated X protein (Bax) und Cysteine-dependent aspartate specific protease 9 (Caspase 9) [95,96]. Es hemmt über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Gruppe die Transkription weiterer proapoptotischer Proteine wie BCL-2 like protein 11 (BIM) [95,96]. Außerdem wirkt es über die Aktivierung der I-κB-Kinase auf den NF-κB –Signalweg [97] und über die Phosphorylierung von MDM2 auf das Tumorsuppressorgen p53 [95]. Auswirkungen auf die Zellproliferation und den Zellzyklus hat AKT über die direkt unterhalb in diesem Signalweg stehende Serin/Threonin-Kinase mTORC1 [95,96]. Vollständig phosphoryliertes und damit aktiviertes AKT verhindert die Bildung des negativen Regulatorkomplexes aus den Tumorsuppressorproteinen TSC1 und TSC2 und aktiviert somit mTORC1 [95,96]. mTORC1 besteht aus mTOR, daran gebundenes regulatory associated protein of mTOR (RAPTOR), mammalian lethal-with-sec-thirteen 8/G-protein β-subunit like protein (mLST8/GβL), proline-rich AKT substrate 40 kDa (PRAS40) und DEP domain-containing mTOR-interacting protein (DEPTOR) [98,99]. mTORC1 ist über die Translation von mRNA an der Regelung des Zellzyklus beteiligt, hemmt Autophagie und sorgt für die Aufnahme der ribosomalen Biosynthese [98]. Aktiviertes mTORC1 wirkt über Phosphorylierung auf den translationalen Repressor 4E-BP1 [95,96]. Unphosphoryliertes 4E-BP1 bindet den Translationsinitiationsfaktor eIF-4E. Durch die Phosphorylierung von 4E-BP1 kommt es zur Freisetzung von eIF-4E und damit zur cap-abhängige Translation der mRNA, worüber die Proteinbiosynthese antiapoptotischer Proteine und Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D1, Mcl-1, c-Myc, BCL-X_L und hypoxia inducing factor 1 (HIF-1) gesteuert wird [100]. Cyclin D1 reguliert die Überschreitung

des G₁-Kontrollpunktes während des Zellzyklus. Mcl-1, ein antiapoptotisches Mitglied der BCL-2-Familie, hemmt über die Bindung an proapoptotische BCL-2-Familienmitglieder wie BIM, p53 upregulated modulator of apoptosis (Puma), Noxa und BCL-2 homologous antagonist killer (Bak) die Apoptose [101]. Außerdem interagiert Mcl-1 mit CDK1 und verzögert somit die Zellzyklusprogression [101]. Desweiteren phosphoryliert und aktiviert mTORC1 die Serin/Threonin-Kinase S6 Kinase 1 (S6K1) an Threonin 389 [98]. Die aktivierte Kinase wiederum sorgt über eine Aktivierung des ribosomalen Proteins S6 für die Phosphorylierung der ribosomalen 40S-Untereinheit und für die Aufnahme der ribosomalen Biogenese [98]. Außerdem sorgt S6K1 für eine Phosphorylierung von rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR), einer Komponente des mTORC2, an Threonin 1135 und hierdurch für eine Hemmung des mTORC2 [98]. Es resultiert hieraus eine verminderte Phosphorylierung und damit auch verminderte Aktivierung von AKT und somit ein negativer Rückkopplungsmechanismus auf mTORC1 [98]. Zusätzlich hat mTORC1 noch eine Schlüsselfunktion bei der Autophagie, da mTORC1 den Autophagieinitiierungskomplex phosphoryliert und somit hemmt [98].

Der Komplex mTORC2 wird zusammengesetzt aus mTOR, RICTOR, mLST8, mammalian stress-activated protein kinase-interacting protein 1 (mSIN1) und zusätzlich dem protein observed with RICTOR (PROTOR) [98]. mTORC2 ist beteiligt an der Regulation der DNA-Transkription und beeinflusst Zellteilung und Zelltod [98]. Der Komplex phosphoryliert und aktiviert AKT an Serin 473 [98]. mTORC2 inaktiviert die Serin/Threonin-Kinase glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) über eine Phosphorylierung an Serin 9 [98]. Hierdurch wird β -Catenin freigesetzt, wandert in den Zellkern und induziert dort über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors t-cell specific transcription factor/lymphoid enhancer binding factor (TCF/LEF) die Transkription von Cyclin D1 und c-Myc [102]. Über die Hemmung von GSK3 β wird die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel NF- κ B, beeinflusst [102].

1.3.1 Der mTOR-Inhibitor RAD001

RAD001 (Freiname: Everolimus) ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der mTOR-Inhibitoren mit immunsuppressiven und antiproliferativen Eigenschaften [103]. Unter den Namen CERTICAN[®] (Europa), ZORTRESS[®] (USA) und AFINITOR[®] wird das Medikament in der Nieren-, Leber- und Herztransplantation gegen Transplantatabstoßungen und in der Onkologie zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms [104], bei

inoperablen oder metastasierten neuroendokrinen Tumoren pankreatischem Ursprung [105], bei fortschreitendem oder rezidivierendem Hormonrezeptor-positiven HER2/neu-negativem Mammakarzinom [106] und bei Kindern ab drei Jahren mit subependyalem Rießenzellastrozytom im Rahmen der tuberösen Sklerose oder bei Erwachsenen mit renalem Angiomyolipom bei tuberöser Sklerose [107] eingesetzt.

RAD001 ist ein Derviat des Naturproduktes Rapamycin, welches aus dem Pilz *Streptomyces hygroscopicus* stammt [108]. Bei Bodenproben auf den Osterinseln, deren einheimische Bezeichnung Rapa Nui namensgebend für Rapamycin war, wurde der Pilz 1964 auf Grund seiner stark antifungalen Wirkung entdeckt [108]. 1972 konnte der Wirkstoff in dem Ayerst Labor in Montreal isoliert werden [109]. In Hefe [110] und später auch in Säugetierzellen [111, 112] konnte der Angriffsort von Rapamycin, das sogenannte Target of Rapamycin (TOR), identifiziert werden. RAD001 ($C_{53}H_{83}NO_{14}$, $M_r = 958.224 \text{ g/mol}$) ist ein großes, lipophiles, makrozyklisches Lakton, welches in den meisten organischen Lösungsmitteln, außer in Wasser, löslich ist [113].

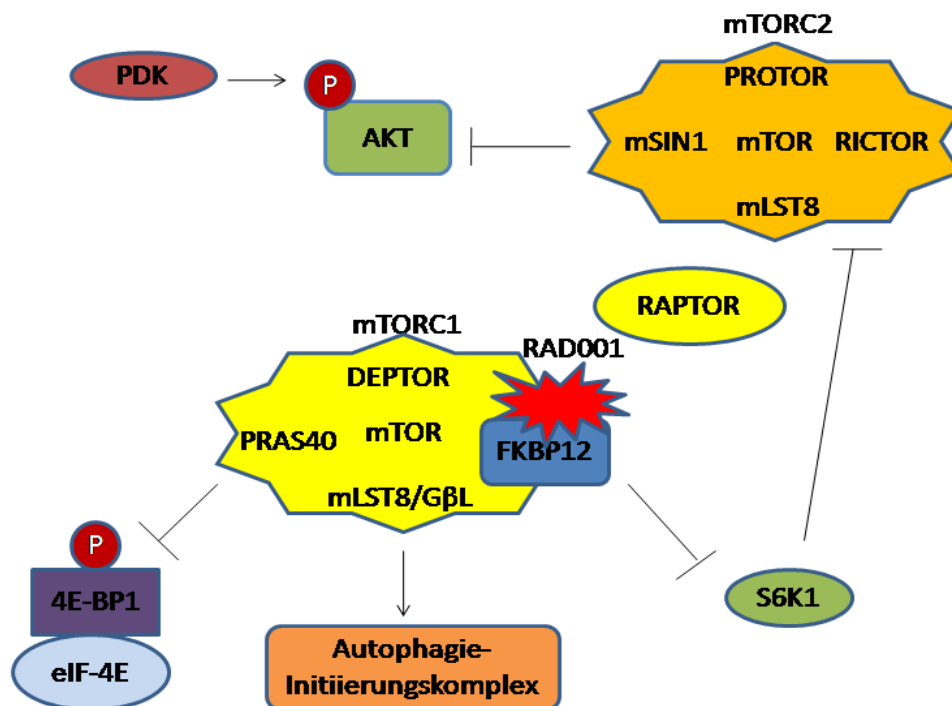


Abbildung 4: Auswirkungen von RAD001 auf den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg modifiziert nach [103, 114, 115] Durch RAD001 gehemmtes mTORC1 verhindert die weitere Phosphorylierung von 4E-BP1 und somit auch die Freisetzung von eIF-4E und den Start der cap-abhängigen Translation [103, 114]. Desweiteren kommt es durch die Hemmung des mTORC1 auch zu einer Inhibierung von S6K1 [115]. Hierdurch wird die Phosphorylierung von mTORC2 durch RICTOR gehemmt und es kommt zur Hemmung von mTORC2 [115]. Die vollständige Phosphorylierung von AKT an Serin 473 durch mTORC2 ist somit nicht möglich [115]. →Resultat; -Hemmung

RAD001 wirkt über eine starke Affinität zu einem intrazellulären Rezeptorprotein, dem Immunophilin FK506-binding protein 12 (FKBP-12). Der RAD001/FKBP-12-Komplex löst RAPTOR aus mTOR und hemmt mTORC1 [103,114] (siehe Abbildung 4).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass nach einer langen Inkubation mit RAD001 *in vitro* auch mTORC2 gehemmt werden kann [115]. RAD001 verhindert über die Inhibierung wichtiger Proteine der Translation und Proteinsynthese die Zellproliferation und Angiogenese, Apoptose wird gefördert und Tumorwachstum verlangsamt. Über die Inhibierung des 4E-BP1/eIF-4E-Wegs und die Hemmung von Cyclin D1 führt RAD001 zu Zellzyklusarrest in der G₁-Phase [116].

In klinische Studien wurde der Einsatz von mTOR-Inhibitoren wie RAD001 oder Temsirolimus bei malignen Lymphomen bereits untersucht. Bei der Behandlung von Patienten mit DLBCL mit RAD001 im Rahmen von klinischen Studien ließ sich die Induktion von Zellzyklusarrest nachweisen [117]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Anwendung von Temsirolimus die Rate an komplettem Ansprechen und das Überleben steigert [118]. Desweiteren wurden in Studien bereits die Kombination von RAD001 mit der Standardtherapie R-CHOP bei Patienten mit DLBCL untersucht [119]. Nach 21,5 Monaten ergaben sich bei 96% der untersuchten 24 Patienten der Nachweis eines Ansprechens (overall response) auf die Therapie [119]. Bis zur letzten Nachsorgeuntersuchung vier Jahre nach Studienbeginn war keiner der Patienten verstorben oder an einem Rezidiv erkrankt [119].

Das Nebenwirkungsprofil von RAD001 ist günstig. Häufiger beobachtete Nebenwirkungen nach oraler Applikation sind Mundulzera, Infektionen, Übelkeit, Abgeschlagenheit, Diarrhö und Hauterscheinungen wie Ekzeme und Akne [116]. Bei mit RAD001 behandelten DLBCL-Patienten zeigten sich hauptsächlich hämatologische Nebenwirkungen wie Thrombozytopenie [117] und Neutropenie [119].

1.4 Cap-abhängige mRNA-Translation

Die Proteinbiosynthese durch Translation der Nukleinsäurecodes auf der mRNA in spezifische proteinogene Aminosäureabfolgen läuft in drei Phasen ab: Initiation, Elongation und Termination [120]. In der Initiationsphase binden die 80S-Ribosomen, bestehend aus einer 40S- und einer 60S-Untereinheit, an die zu translatierende mRNA [120]. Es schließt sich nach dem Erreichen des Start-Codons das Ablesen der Nukleinsäurecodes und die Bildung der Peptidkette in der Elongationsphase an [120].

Dieser Prozess endet mit der Terminationsphase mit einem der drei Stop-Codons. Die neu entstandene Peptidkette wird freigesetzt, das 80S-Ribosom zerfällt wieder in seine beiden Untereinheiten und der nächste Translationszyklus kann beginnen [120].

Auf der Stufe der Translationsinitiation erfolgt die Regulation der Proteinsynthese. Die Kontrolle der Initiation ist dabei entscheidend und mTORC1-, PIM- und ERK-vermittelte Signale sind wesentlich daran beteiligt [54,61,98,100].

Benötigt werden für den Ablauf der Initiation in Eukaryonten die mRNA mit dem Startcodon aus dem Basentriplett Adenin, Uracil und Guanin (AUG), die ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten, die Methionin-Initiator-Aminoacyl-Transfer-RNA ($tRNA_i^{Met}$), verschiedene Initiationsfaktoren (eIF) und Guanosintriphosphat (GTP) [120].

Die mRNA in Eukaryonten weist am 5'-Ende eine Kappengruppe (cap) auf und am 3'-Ende befindet sich ein Poly(A)-Schwanz [120]. Die 5'-Kappe besteht aus einem methyliertem Guanin-Nukleotid (m^7GpppN), welches über eine 5'-5'-

Triphosphatbindung an das erste Nukleotid der mRNA gekoppelt ist [120]. Die Kappengruppe schützt die mRNA vor dem Abbau durch Ribonukleasen, dient als Signal für den Transport der mRNA durch Kernporen und kontrolliert die Translationsinitiation. Der Initiationsvorgang findet an dem sich bildenden 80S-Ribosom in mehreren Schritten statt [121].

Im ersten Schritt entsteht der Prä-Initiationskomplex. An die ribosomale 40S-Untereinheit binden sich die Initiationsfaktoren eIF-1 und eIF-3 [121]. Diese Bindung dient zur Blockade der Exit-Stelle (E-Stelle) und der Aminoacyl-Stelle (A-Stelle) auf der Untereinheit [121]. Somit ist auf dem 40S-Ribosom nur die korrekte Position für die $tRNA_i^{Met}$ an der Peptidyl-Stelle (P-Stelle) frei [121]. Aus eIF-2 und der $tRNA_i^{Met}$ wird der ternäre Komplex gebildet. Der Komplex bindet sich durch eIF-1A an die P-Stelle und somit entsteht die 43S-Untereinheit [122,123,124]. Komplettiert wird dieser Prä-Initiationskomplex noch durch eIF-5, der die GTPase-Aktivität von eIF-2 stimuliert [125].

Es schließt sich nun im nächsten Schritt die Anlage der mRNA an. An die cap-Gruppe der mRNA bindet sich der Initiationsfaktorenkomplex eIF-4F, bestehend aus der Helikase eIF-4A, dem Adaptorprotein eIF-4G und dem cap-Bindungsprotein eIF-4E [122,123]. Es folgt die Verbindung der mRNA mit dem Prä-Initiationskomplex. Eine äußerst wichtige und funktionell nicht durch andere Initiationsfaktoren ersetzbare Komponente in dem Heterodimer ist eIF-4E. eIF-4E liegt im Zytosol gebunden an 4E-BP1 vor [77]. 4E-BP1 reguliert die Bindung zwischen eIF-4E und eIF-4G und somit die Komplettierung des Heterodimers eIF-4F, indem es das eIF-4E-Bindungsmotiv von eIF-

4G imitiert [77]. Wird 4E-BP1 vollständig phosphoryliert, kann sich eIF-4E aus dieser Bindung lösen und wandert in den Zellkern [77]. Die Phosphorylierung von 4EB-P1 und damit auch Freisetzung von eIF-4E wird sowohl durch ERK-vermittelte Signale [54] als auch durch PIM-Kinasen [61] und mTORC1 [100] gesteuert. Durch seine besondere Struktur bindet eIF-4E an eIF-4G und lagert sich ebenso direkt an die m⁷GpppN – Kappe an [126, 127]. Der Poly(A)-Schwanz bindet sich durch ein Poly(A)-bindendes Protein (PABP) am 3'-Ende und durch eIF-4G am 5'-Ende als schleifenartige Struktur in Richtung des 5'-Endes [128]. Hierdurch wird sichergestellt, dass die Translation nicht zu früh beginnt [128].

Nach der Bindung der mRNA an den ribosomalen 43S-Komplex wird nun die mRNA vom 5'-Ende in Richtung des 3'-Endes bis zum Erreichen des Start-Codons gescannt. Beim Scannen und Erkennen des Start-Codons spielen die Initiationsfaktoren eIF-1 und eIF-1A eine entscheidende Rolle [129]. AUG wird an der P-Stelle der ribosomalen 40S-Untereinheit positioniert und die tRNA_i^{Met} wird exakt platziert. eIF-2 spaltet sich nach der Hydrolyse des daran gebundenen GTP durch eIF-5 ab [125].

Im letzten Schritt der Translationsinitiation folgt das Zusammenfügen zum funktionsfähigen 80S-Initiationskomplex. Mithilfe der GTPase eIF-5B lagert sich die ribosomale 60S-Untereinheit an [130]. Das an eIF-5B gebundene GTP wird hydrolysiert, eIF-5B, eIF-1A und eIF-3 werden freigesetzt und dissoziieren [130]. Der Elongationszyklus schließt sich an.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Eine Fehlregulation des PI3/AKT/mTOR-Signalwegs lässt sich bei vielen Tumoren nachweisen [95,97]. Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit Therapieansätzen in diesem Signalweg. RAD001, ein mTOR-Inhibitor, ist bei Lymphomen eine relativ gut erforschte Substanz [103,116,117,119]. Temsirolimus ein weiterer, dem RAD001 vergleichbarer, Inhibitor des mTORC1 ist für die Therapie von Mantelzell-Lymphomen zugelassen [131] und es existieren auch Daten aus einer Studie mit an DLBCL erkrankten Patienten [118]. Rituximab ist ein CD20-Antikörper und ein Standardimmuntherapeutikum bei B-Zell-Lymphomen [56]. Während ein wesentlicher Teil der Patienten mit DLBCL schon mit gegenwärtiger Therapie geheilt werden kann, sterben weiterhin 30 bis 40% der Patienten an dieser Erkrankung [37]. Das gilt insbesondere für Patienten mit ABC DLBCL, aber in geringerem Umfang auch für Menschen mit GCB DLBCL [20]. Es besteht daher ein anhaltend großes Interesse an

einem weitergehenden Verständnis dieser Erkrankung und an der Identifikation neuer therapeutischer Ziele. Ein mögliches therapeutisches Ziel könnte der Translationsinitiationskomplex eIF-4F und darüber die Herunterregulation der cap-abhängigen mRNA-Translation darstellen. Die PIM-Signalwegkaskade, zu welcher zu Beginn dieser experimentellen Arbeit im Jahr 2011 noch keine Publikationen zu DLBCL vorlagen, beeinflusst gemeinsam mit dem PI3/AKT/mTOR-Signalweg und dem MAP-ERK-Signalweg die Bildung des Translationsinitiationskomplexes. Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit eine *in vitro* Untersuchung des PIM-Signalwegs bei verschiedenen DLBCL-Zelllinien sowie bei primären Zellen aus Lymphknotenexstirpationen erfolgen. Zuerst werden die Substanzen RAD001, Rituximab und die verschiedenen verfügbaren PIM-Inhibitoren einzeln auf ihre antiproliferative Wirkung untersucht und anschließend werden die Substanzen kombiniert und ihre Wirkung sowohl auf die Proliferationshemmung als auch auf ihre Auswirkungen auf Proteine der Signalwege analysiert. Bei Malignomen haben sich Kombinationstherapien in vielen Fällen als wirksamer im Vergleich zu Einzeltherapie herausgestellt.

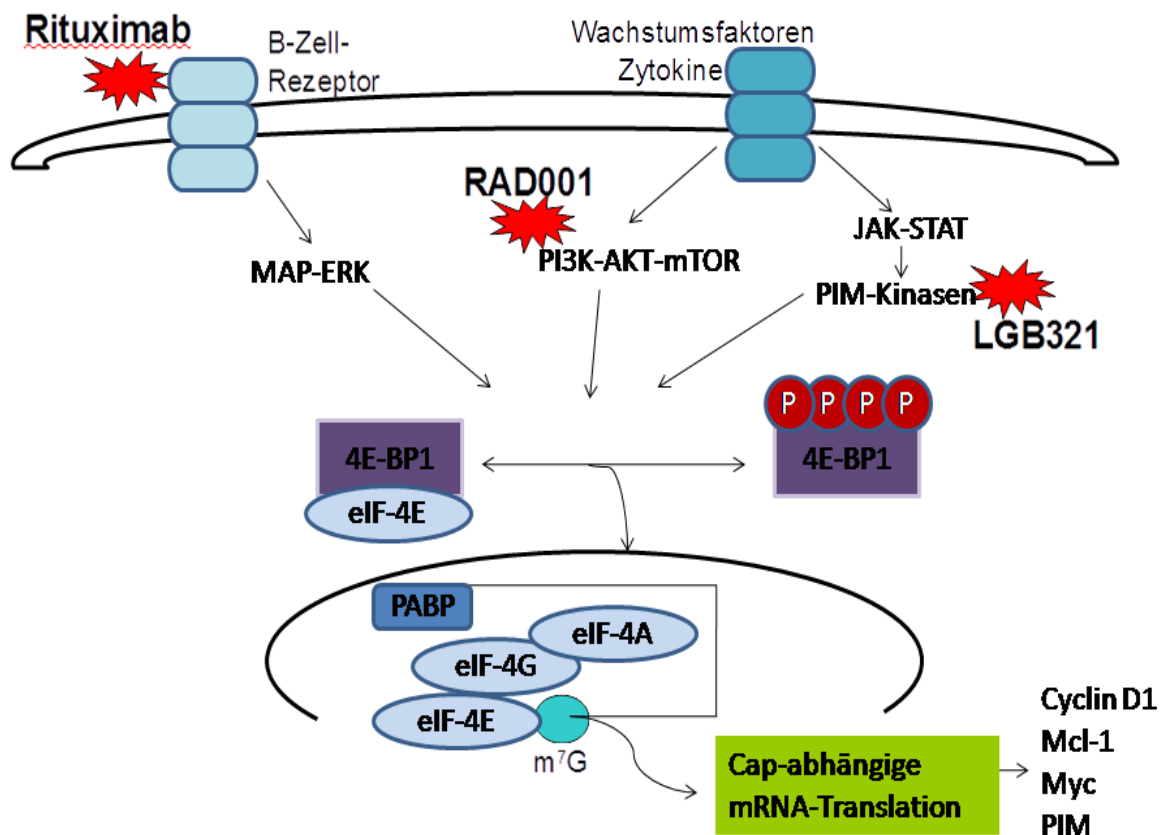


Abbildung 5: Zusammenfassung der für diese Arbeit relevanten Signalwege bei DLBCL modifiziert nach [54,61,100,126]

Folgende Fragen sollen in dieser Arbeit beantwortet werden:

- Ist es möglich einen antiproliferativen Effekt mit PIM-Inhibitoren auf DLBCL-Zellen zu erreichen und wie groß ist der maximal mögliche hemmende Effekt auf das Wachstum der Zellen?
- Wirken die PIM-Inhibitoren unterschiedlich auf verschiedenen DLBCL-Zelllinien und gibt es bezüglich der Wirkung Unterschiede bei den Subtypen ABC und GCB?
- Inwieweit lässt sich durch Kombination eines PIM-Inhibitors mit RAD001 und Rituximab der antiproliferative Effekt auf DLBCL-Zellen steigern? Wirkt die Kombination auch bei primären DLBCL-Zellen?
- Reagieren die verschiedenen DLBCL-Zelllinien unterschiedlich auf die Kombination und betreffen die Unterschiede die beiden Subtypen?
- Geht der antiproliferative Kombinationseffekt beim DLBCL mit vermehrtem Zelltod einher? Falls ja:
 - Durch welchen Mechanismus entsteht der vermehrte Zelltod bei der Kombination?
 - Können durch den zytotoxische Kombinationseffekt Modifikationen in für das Überleben von DLBCL-Zellen entscheidenden intrazellulären Signalkaskaden aufgezeigt werden?
- Hat die Kombination der drei Substanzen Einfluss auf die cap-abhängige mRNA-Translation? Lässt sich durch Hemmung der mTORC1-, PIM- und ERK-vermittelten Signale in die Bildung des Translationsinitiationskomplexes eingreifen und dadurch die cap-abhängige mRNA-Translation zum Erliegen bringen?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Arzneistoffe

Tabelle 2: Liste der verwendeten Arzneistoffe und Inhibitoren

Substanzklasse	Name	Bezugsquelle
mTOR-Inhibitor	RAD001	Novartis, Basel, CH
CD-20-Antikörper	Rituximab	Apotheke der Charité Universitätsmedizin Berlin
PIM-Inhibitoren	SGI-1773	Selleck Chemicals, Houston, USA
	SGI-1776	Selleck Chemicals, Houston, USA
	LGB321	Novartis, Basel, CH

Rituximab wurde von der zentralen Zytostatikazubereitung der Apotheke der Charité Universitätsmedizin Berlin als intravenöse (i.v.) Applikation bezogen und vor der Benutzung frisch zubereitet. Die restlichen Zytostatika wurden zur Herstellung von Stocklösungen von 10mM in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C tiefgefroren. Vor dem Gebrauch wurden sie dann vorsichtig im Wasserbad aufgetaut, in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Zellkulturmedium aufgelöst und bis zu der benötigten Konzentration verdünnt.

2.1.2 Antikörper

Tabelle 3: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für die Western Blot Analysen

Zielprotein	Verdünnung	Bezugsquelle
Primärantikörper		
4E-BP1 (53H11) Rabbit mAb	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti- Actin Antibody produced in rabbit	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bad Rabbit Ab	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Cleaved Caspase 3 (D175) (5A1E) Rabbit Ab	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Cleaved Caspase 9 (D330) (Human Specific) Rabbit Ab	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
c-Myc (9E10) sc-40 mouse monoclonal IgG ₁	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
eIF-4E Rabbit Ab	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
eIF-4G1 Rabbit Ab	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Mcl-1 (S-19) sc-819 rabbit polyclonal IgG	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) Antibody	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p44/42 MAP Kinase Antibody	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p-Bad (S112) Rabbit Ab	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
p-eIF-4E (S209) Rabbit Ab	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
PIM-1 (C93F2) Rabbit mAb	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
PIM-2 (D1D2) XP (TM) Rabbit mAb	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
PIM-3 (D17C9) Rabbit mAb	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (197G2) Rabbit mAb	1 : 10 000 in 5% Milchpuffer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Sekundärantikörper		
Anti-mouse Ig, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from sheep)	1 : 40 000 in 1% Milchpuffer	Amersham, Piscataway, USA
goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2030	1 : 40 000 in 1% Milchpuffer	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Peroxidase-conjugated AffiniPure Mouse Anti-Goat IgG (H+L)	1 : 40 000 in 1% Milchpuffer	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove USA

2.1.3 Fertigkits und Chemikalien

Tabelle 4: Liste der verwendeten Substanzen

Artikel	Bezugsquelle
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Acrylamid 40%ig	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg, D
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, D
Tumor Dissociation Kit, human Enzyme H, R, A	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, D
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ECL Prime™ blocking agent	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Entwickler	Kodak, Rochester, USA

Ethanol 96% unvergällt	J.T.Baker, Phillipsburg, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
Fixierer	Kodak, Rochester, USA
Glycerin	Serva, Heidelberg, D
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Chlorwasserstoff (HCl) 2M	Merck, Darmstadt, D
Iscove´s modifiziertes Dulbecco´s Medium (IMDM) Zellkulturmedium	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, D
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
NP-40	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphat-gepufferte isotone Kochsalzlösung (PBS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom AG, Berlin, D
PhosphoSafe	Novagen/Merck, Darmstadt, D
Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards, Größenmarker	Bio-Rad, Hercules, USA
Propidiumiodid (PI)	Bender Med Systems, Heidelberg, D
Protease inhibitor cocktail tablets	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping	Solution Chemicon International, Temecula, USA
Ribonuklease (RNase) A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RPMI 1640 Zellkulturmedium	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, D
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, D
Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt, D
Tris Base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trisodiumcitrat (2 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trockenmilchpulver	Bio-Rad, Hercules, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Liste der verwendeten Substanzen

Artikel	Herstellung
MTT-1 Reagenz	5 mg/ml 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in PBS
MTT-2 Reagenz	10% SDS in 0,01 M HCl
Trenngel 10 / 12 % für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	Aqua dest. 4,8 / 4,3 ml Acrylamid 40%ig 2,5 / 3 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 2,5 ml 10% SDS (w/v) 100 µl 10% APS (w/v) 100 µl

	TEMED	10 µl
Sammelgel 4% für SDS-PAGE	Aqua dest.	1,6 ml
	Acrylamid 40%ig	250 µl
	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	625 µl
	10% SDS (w/v)	25 µl
	10% APS (w/v)	25 µl
	TEMED	5 µl
10x Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE pH 8,3-8,4	Tris-Base (125 mM)	45 g
	Glycin (960 mM)	216 g
	SDS (4 mM)	15 g
	Aqua dest. auf 1,5 l	
4x Ladepuffer für SDS-PAGE	0,5 M Tris-HCl	1,25 ml
	Glycerin	2,5 ml
	20% SDS	5 ml
	1% Bromphenolblau	1,25 ml
2x SDS für SDS-PAGE	0,5 M Tris-HCl	0,2 ml
	10% SDS	8 ml
	Glycerin	2 ml
	Aqua dest. auf 20 ml	
10x Transferpuffer für Western Blot	Tris-Base	58,2 g
	Glycin	29,3 g
	SDS	3,75 G
	Aqua dest. auf 1 l	
Lysepuffer für Proteinkonzentrationsbestimmung	PhosphoSafe	
	10% Proteaseinhibitorlösung (1Tablette auf 1 ml H ₂ O)	
Waschpuffer PBS / Tween 20 (PBS-T)	Aqua dest.	1 l
	PBS	200 ml
	Tween 20	2 ml
Puffer A für m ⁷ GTP pull-down Assay	10 mM Tris-HCl pH 7,6	
	150 mM KCl	
	4 mM MgCl ₂	
	1 mM DTT	
	1 mM EDTA	
	Proteaseinhibitoren ergänzt mit 1% NP-40	

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Tabelle 6: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Artikel	Bezugsquelle
96-Loch-Platte unsteril	NUNC/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Extra thick blotpaper	Bio-Rad, Hercules, USA
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg, D
Filter cards	Bio-Rad, Hercules, USA
GentleMACS™ C Tubes	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, D
Hyperfilm™ ECL	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
KODAK BioMax MR Film	Kodak, Rochester, USA
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden, D

Mikrozentrifugengefäße (0,5 , 1,5 und 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Multipette® Plus	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	BD Falcon, Rutherford, USA bzw. Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen (10, 200, 1000, 2500 µl)	Eppendorf, Hamburg bzw. Sarstedt, Nümbrecht, D
PVDF-Membran	Bio-Rad, Hercules, USA
Transferpipette-8 (20-200µl)	Eppendorf, Hamburg bzw. Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ²	BD Falcon, Rutherford, USA
Zellkulturplatten (1-, 6-, 12-, 24-, 96-Loch)	BD Falcon, Rutherford, USA
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	BD Falcon, Rutherford, USA

2.1.6 Geräte

Tabelle 7: Liste der verwendeten Geräte

Artikel	Bezugsquelle
Semi-Dry-Blotter (Hoefer SemiPhor semi-dry transfer unit)	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
Brutschrank (HERA cell 240)	Heraeus, Langenselbold, D
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, Hercules, USA
ELISA-Reader „Anthos Microplate Reader HT2“ inkl. Software WinRead	Anthos Mikrosysteme, Krefeld, D
FACS Calibur	BD Immunocytometry Systems, Rutherford, USA
GentleMACS™ Dissociator	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, D
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr Instruments, Bosch Instruments
Laminarbox (TECHNOFLOW 3F120-II GS)	Integra Biosciences, Fernwald, D
Lichtmikroskop (diverse)	Leica, Wetzlar, D
MACSmix™ Tube Rotator	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, D
Magnetrührer (Ikamag RCT)	IKA, Staufen, D
Photokammer (Agarosegel)	Bio-Rad, Hercules, USA
Photokassette (Hypercassette™)	Amersham, Piscataway, USA
Photometer	NanoDrop, Wilmington, USA
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000, 2500 µl)	Eppendorf, Hamburg, D bzw. Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe (Pipetboy)	Integra Biosciences, Fernwald, D
Schüttler (IKA KS 130 basic)	IKA, Staufen, D
Stickstofftank (Cryo 2000)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Thermoblock (Trio-Thermoblock)	Biometra, Göttingen, D
Thermocycler TaqMan	Biometra, Göttingen, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Vortexer (REAC control)	Heidolph, Schwabach, D
Waagen (Sartorius Basic)	Sartorius, Göttingen, D
Wasserbad (julabo SW-21C)	Julabo Labortechnik, Seelbach, D
Zentrifugen (diverse)	Heraeus, Langenselbold, D bzw. Hettich,

	Tuttlingen, D
--	---------------

2.1.7 Software

Tabelle 8: Liste der verwendeten Software

Cellquest Pro für FACS-Analysen	BD Biosciences, Rutherford, USA
WinRead für MTT-Analysen	Anthos Mikrosysteme, Krefeld, D
Microsoft Office Exel 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse wurden an insgesamt 12 DLBCL-Zelllinien sowie einer Primärzellkultur aus einem Lymphknoten eines mit DLBCL befallenen Patienten erarbeitet. Die DLBCL-Zelllinien Hbl1, Riva, SU-DHL2, U2932, SU-DHL4, Oci Ly3, Oci Ly10 und SU-DHL6 wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Georg Lenz, zu diesem Zeitpunkt an der Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow-Klinikum, zur Verfügung gestellt. Die weiteren Zelllinien SU-DHL10, DB, Toledo und Oci Ly2 bezogen wir von der Arbeitsgruppe um Dr. Hans Guido Wendel aus dem Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York. Der befallene Lymphknoten eines Patienten mit gesichertem DLBCL wurde durch das Team um Frau Professor Dr. med. Mino Lenarz, zu diesem Zeitpunkt Direktorin der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am Campus Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin entnommen. Dies erfolgte nach Aufklärung und Unterschrift des Patienten. Hierzu existiert ein Ethikvotum der Charité Universitätsmedizin Berlin (EA2/115/12).

2.2.2 Kultivierung

Tabelle 9: Liste aller verwendeten humanen Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	ATCC-Nummer od. DSMZ-Nummer	Kultiviert in
Hbl1	ABC-Zelllinie		RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % P/S
Riva (auch RI-1 genannt)	ABC-Zelllinie	DSMZ: ACC 585	RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % P/S
SU-DHL2	ABC-Zelllinie		RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % P/S
Oci Ly3	ABC-Zelllinie	DSMZ: 761	IMDM

			+ 20 % humanem Plasma + 1 % P/S
Oci Ly10	ABC-Zelllinie		IMDM + 20 % humanem Plasma + 1 % P/S
U2932	ABC-Zelllinie		RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % P/S
TMD8	ABC-Zelllinie		RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % P/S
DB	GCB-Zelllinie	ATCC: CRL-2289 DSMZ: 539	RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % P/S
SU-DHL4	GCB-Zelllinie	DSMZ: 495	RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % P/S
SU-DHL6	GCB-Zelllinie	DSMZ: 572	RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % P/S
SU-DHL10	GCB-Zelllinie	ATCC: CRL-2963 DSMZ:576	RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % P/S
Toledo	GCB-Zelllinie	ATCC: CRL-2631	RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 % P/S
Oci Ly2	GCB-Zelllinie		IMDM + 20 % FBS + 1 % P/S

Die Zellen wurden zum Aufbewahren in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Hierzu wurden zuerst jeweils 1×10^6 Zellen in 1,5 ml Einfriermedium, bestehend aus 90% fetalem Kälberserum (FBS) und 10% DMSO, in ein Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden bei -80°C eingefroren und nach einigen Tagen in Stickstoff-Tanks mit -196°C überführt. Die Zellsuspensionen wurden bei Bedarf im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in 10 ml Medium gewaschen, um das DMSO-haltigen Einfriermedium zu entfernen, zentrifugiert und das Pellet in frischem Medium resuspendiert und kultiviert.

Die in Kultur befindenden Zellen wurden in unbeschichteten Gewebekulturflaschen in einem sterilen Brutschrank bei 37°C mit einer Frischluftzufuhr mit konstanten 5 %-Kohlendioxid (CO_2)-Anteil gelagert. Bedarfsgerecht wurde ein Teil der Zellen entfernt, den Zellen wurde frisches Medium hinzugefügt und alle drei bis vier Tage wurden die Zellen passagiert.

2.2.3 Präparation primärer DLBCL-Zellen aus humanem Lymphknoten

Die Entnahme des Lymphknotens erfolgte durch das Team um Frau Professor Dr. med. Minoo Lenarz zu diesem Zeitpunkt Direktorin der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am Campus Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin. Die Präparation der Zellen aus dem humanen Lymphknoten erfolgte durch mechanische und enzymatische Verkleinerung. Der Lymphknoten wurde zuerst unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell in kleine Stücke von 2-4 mm zerkleinert. In einem gentleMACS C Tube wurden die Tumorstücke mit 4,7 ml RPMI 1640 Medium und einem Enzymmix aus 200 µL Enzyme H, 100 µL Enzyme R und 25 µL Enzyme A versetzt. In drei Schritten (1 x Programm h_tumor_01 und 2 x h_tumor_02) wurden die Tumorstücke durch den GentleMACS™ Dissociator zerkleinert. Zwischen den Zerkleinerungs-Schritten wurden die Zellen bei 37°C für je 30 Minuten rotiert. Anschließend wurden die Zellen kurz anzentrifugiert, der Überschuss wurde verworfen und die Zellen dann filtriert und in Medium gewaschen. Die Zellkonzentration und die Zellviabilität wurden mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Zur Kultur wurden die Zellen auf 12-Well-Platten ausgesät und im Brutschrank bei 37°C mit einer Frischluftzufuhr mit konstanten 5 %-CO₂-Anteil für 24 Stunden kultiviert.

2.2.4 Zellzahlbestimmung

Für die einzelnen Experimente wurden die Zellen mit einer definierten Zellzahl (1-Methyl-1H-Tetrazol-5-Thiol-Test (MTT): 1*10⁵ Zellen/ml, Western Blot: 1*10⁶ Zellen/ml, Zellzyklusanalyse: 1*10⁶ Zellen/ml) auf die Platten ausgesät. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mikroskopisch ausgezählt. Die Zellsuspension wurde mit Phosphat-gepufferte isotone Kochsalzlösung (PBS) 1:1 verdünnt, ein Aliquot dieser Mischung wurde wiederum mit Trypanblau 1:1 verdünnt und eingefärbt. Anschließend wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen, um in einer Neubauer-Zählkammer die vitalen Zellen zu zählen. Trypanblau tritt durch die Poren der Membranen toter Zellen in das Zytoplasma ein und färbt die Zellen dunkelblau an. Somit lassen sich lebendige, farblose Zellen von toten Zellen im Lichtmikroskop unterscheiden. Nach dem Auszählen wurde die Zellzahl anhand folgender Formel ausgerechnet:

$$\text{Zellzahl (/ml)} = (\text{Gezählte vitale Zellen}/4) * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^5$$

2.2.5 Behandlung mit Substanzen

Um Zellen zu behandeln, wurde zuerst die Zellzahl bestimmt und anschließend je nach Versuch eine bestimmte Anzahl von Zellen in frischen Medium resuspendiert und mit

unterschiedlichen Konzentrationen der Substanzen für eine definierte Zeitspanne im Brutschrank kultiviert.

2.3 MTT-Test

Die Wirkung einer Substanz auf die Zellaktivität wurde mittels MTT-Test ermittelt. Hierbei handelt es sich um einen Test, der auf der Farbumwandlung des gelben Farbstoffs Tetrazoliumsalz 3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT1-Reagenz) durch stoffwechselaktive Zellen zu lila gefärbtem Formazan beruht. Die Formazankristalle lösen sich in der Zellmembran, MTT2-Reagenz, ein Puffer, greift diese an und sorgt für eine weitere Farbumwandlung der Probe zu dunkellila-blau. Die Färbung lässt sich photometrisch messen, je intensiver die Farbumwandlung, umso höher ist die metabolische Aktivität der behandelten Zellen.

Die benötigte Konzentration der DLBCL-Zelllinien betrug $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Zunächst wurden je 90 μ l der Zellen pro Vertiefung auf einer 96-Well-Platte ausgesät und anschließend mit je 10 μ l der entsprechenden Substanz behandelt. Die Substanzen - mit Ausnahme von Rituximab - wurden in DMSO gelöst, deshalb wurde eine DMSO-Kontrolle entsprechend der höchsten Konzentration an DMSO in den verwendeten Substanzen sowie eine Nativkontrolle, das heißt Medium-Kontrolle, mitgeführt. Es zeigten sich bei der DMSO-Kontrolle keine wesentlichen Unterschiede in der metabolischen Aktivität der Zellen im Vergleich zur Nativkontrolle, weswegen in weiteren Experimenten keine DMSO-Kontrolle mehr mitgeführt wurde.

Die Zellen wurden 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert, nach 68 Stunden wurden je 10 μ l MTT1-Reagenz und am Ende der 72 Stunden wurden je 100 μ l MTT2-Reagenz pro Vertiefung hinzugegeben. Es folgten weitere 24 Stunden Inkubation im Brutschrank, um die Formazankristalle vollständig zu lösen. Anschließend wurde die Farbveränderung mittels ELISA-Reader Anthos Microplate Reader HT2 bei 512 nm gemessen und mit Hilfe der Software WinRead ausgewertet.

Für jede zu untersuchende Konzentration der Substanzen wurden bis zu sechs Parallelproben angesetzt. Die Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt, das heißt die Ergebnisse eines Versuches wurden mit zwei weiteren unabhängigen Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen bestätigt.

2.4 Zellzyklusanalyse

Bei der Zellzyklusanalyse mittels eines Durchflusszytometers wird bestimmt in welcher Phase ihres Lebenszyklus sich eine Zelle befindet. Dies lässt sich durch den

unterschiedlichen DNA-Gehalt im Zellkern in der jeweiligen Phase ermitteln. Zellen in der G_1 - Phase haben einen einfachen Chromosomensatz, Zellen in der G_2 - Phase einen doppelten Chromosomensatz. Zellen in der S - Phase befinden sich zwischen der G_1 - und der G_2 -Phase und dem entsprechend haben sie auch einen DNA-Gehalt, der dem zwischen einem einfachen und doppelten Chromosomensatz entspricht. Für die Zellzyklusanalyse wird der fluoreszierende Farbstoff Propidiumiodid (PI), der sich an doppelsträngige DNA bindet, verwendet. Da sich PI unspezifisch auch an doppelsträngige RNA bindet und dies das Messergebnis verfälscht, werden die Proben zusätzlich mit einer RNase behandelt. Durchflusszytometrisch werden die mit PI gefärbten Zellen gemessen, in dem sie an einem Laserstrahl vorbeigeleitet werden. Der Laserstrahl führt beim Auftreffen auf PI zur Anregung von Elektroden. Elektroden springen hierbei kurzzeitig auf ein höheres Energieniveau. Bei der Rückkehr auf das Ausgangsniveau stoßen sie die Energie in Form von Photonen ab, welche auf einem Photodetektor gemessen werden. Hierdurch kann auf den Gehalt an PI in der Zelle geschlossen werden. PI verhält sich proportional zu der Konzentration an doppelsträngiger DNA in den Zellen und so wird ermittelt in welcher Zellzyklusphase die Zelle sich befindet.

Die DLBCL - Zelllinien wurden in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit je 2 ml pro Vertiefung auf eine 12-Well-Platte überführt und mit den verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen behandelt. Zusätzlich lief pro Zelllinie noch eine Nativkontrolle mit. Nach 72 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank erfolgte die Sammlung der Zellen durch Zentrifugation bei 1500 rpm für acht Minuten. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 100 μ l PBS resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden unter starkem Vortexen mit 2 ml auf Eis gekühltem 70% Ethanol überschichtet und 40 Minuten auf Eis zum Fixieren gelagert. Anschließend wurden die Zellen erneut in zwei Waschschritten mit PBS gewaschen und dann für eine Stunde mit 500 μ l RNase- und PI-haltiger Lösung bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschriff mit PBS wurden die Zellen durchflusszytometrisch an einem FACSCalibur gemessen. Die Ergebnisse wurden mit der Software Cellquest Pro ausgewertet.

Die verschiedenen Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt, das heißt die Ergebnisse eines Versuchs wurden mindestens mit zwei weiteren unabhängigen Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen bestätigt.

2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

2.5.1 Proteinextraktion

Nach der Behandlung der Zellen mit den Substanzen (siehe 2.2.5) wurden die Zellsuspensionen in Zentrifugenröhrchen überführt und in zwei Waschschrritten mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 50 µl Lysepuffer lysiert und je dreimal eingefroren, stark verwirbelt und wieder aufgetaut. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation mit 13000 rpm bei 4°C wurde der Überstand in ein 500 µl-Mikrozentrifugiergefäß überführt und das Pellet verworfen. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Überstand. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA Protein Assay Kit

Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde die kolorimetrische Methode mittels Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit nach Pierce gewählt. Hierbei reduzieren die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan sowie Peptidbindungen Kupfer (II)-Ionen (Cu^{2+}) zu Kupfer (I)-Ionen (Cu^+). Im zweiten Reaktionschritt bildet Cu^+ mit BCA ein Farbkomplex, der bei 562 nm eine starke Absorption zeigt. Der Farbkomplex wird mit der Verfärbung von Eichlösungen bekannter Proteinkonzentration verglichen. Durch die Messung der optischen Dichte der Lösungen wird die Proteinmenge ermittelt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben wurden die Proben 1:50 mit PBS verdünnt. Nach Angaben des Herstellers wurden in je drei Vertiefungen einer 96-Well-Platte je 30 µl einer Standardverdünnungsreihe, bestehend aus einem Leerwert mit PBS und je 30 µl bovines Serumalbumin (BSA), verdünnt in PBS, in den Konzentrationen 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml und 500 µg/ml, und je 30 µl der zu bestimmenden Proben pipetiert. Zusätzlich wurden den Vertiefungen 200 µl des BCA-Assay-Kits (50 Teile des Reagenz A zu 1 Teil des Reagenz B) zugeführt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler wurde die Platte mittels ELISA-Reader bei 562 nm gemessen und anhand der mitgeführten Standardkonzentrationskurve konnten die Proteinkonzentrationen in den Einzelproben errechnet werden.

2.5.3 SDS-Polyacrylamidgel-Gelelektrophorese

Zuerst wurde das zur Auftrennung der Proben benötigte Gel hergestellt. Dieses besteht aus einem 1 mm dicken 8%, 10% oder 12% Polyacrylamid-haltigem Trenngel, welches

in eine Laufkammer gegossen wurde und dann mit 200 µl Isopropanol zur Glättung des Gels beschichtet wurde. Nach etwa einer Stunde verfestigte sich das Trenngel und ein 4% Polyacrylamid-haltiges Sammelgel konnte in die Laufkammer gefüllt werden. Zur Herstellung der Taschen für die Ladung der Proben wurde ein Kamm eingelegt. Das fertige Gel wurde in einen Tauchständer geklemmt und in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresewanne gestellt. Im nächsten Schritt wurden die Proben hergestellt. Pro Probe wurden 40 µg Protein verwendet (Ausnahme: m⁷GTP pull-down Assay, hierfür wurden 300 µg Protein verwendet, siehe 2.6.6). Die verwendete Proteinmenge wurde mit zweifach Natriumdodecylsulfat (SDS) auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt und 5 µl vierfacher Ladepuffer, welcher mit 20% β-Mercaptoethanol, zur Spaltung von gegebenenfalls enthaltenen Disulfidbrücken, zugesetzt war, wurde zugefügt. Die Proben wurden für zehn Minuten bei 95°C inkubiert und dann bei 13000 rpm und 4°C für drei Minuten zentrifugiert. Hierbei wurde die Sekundär-, Tertiär- und Quartiärstruktur der Proteine zerstört. Pro Geltasche wurden 25 µl Probe geladen. Die erste und letzte Tasche wurde mit 7 µl Größenmarker gefüllt, um die gesuchte Bande des Proteins einer Größe zuordnen zu können. Die Elektrophorese erfolgte bei 60-100 V, 25 mA und 300 W bis die blaue Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte.

2.5.4 Western Blot mit Semi-Dry-Transfer

Nach der Auftrennung der Proteine in der Elektrophorese wurden die Proben vom Trenngel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDV) - Membran geblottet. Die PVDV-Membran wurde zuvor zur Aktivierung für eine Minute in Methanol inkubiert. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Sammelgel vom, nun die Proben enthaltenden, Trenngel entfernt. Trenngel, Blotpapier und PVDV-Membran wurden für 30 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Für den Semi-Dry Blot wurden alle Komponenten in einer bestimmten Reihenfolge geschichtet (1. Blotpapier, 2. Membran, 3. Gel, 4. Blotpapier) und die beim Schichten entstandenen Luftblasen wurden in jeder Schicht durch Rollen eines Glasstabs vorsichtig entfernt. Der Blot erfolgte mit 15 V und 2 A für 90 Minuten. Nach dem Blotten wurde mittels reversibler Panceau S Solution das Übertreten der Proteine vom Gel auf die PVDV-Membran überprüft. Verließ das Blotten erfolgreich, färbte sich hierbei die PVDV-Membran rötlich ein. Anschließend wurde die Membran mit Aqua dest. auf dem Schüttler gewaschen, um die entstandene Rotfärbung zu entfernen.

2.5.5 Detektion der Proteine

Mittels Antikörper und bestimmter Detektionsmethoden lassen sich die auf der PVDV-Membran befindenden Proteine sichtbar machen. Die Membranen wurden nach dem Blotting und der Kontrolle mittels Rotfärbung in 5% Milchpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungen auf der Membran zu blockieren. Nach einer Stunde wurde der 5% Milchpuffer verworfen und ein in neuem 5% Milchpuffer gelöster Primärantikörper wurde über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach mehreren Waschschritten (2 x 10 Minuten und 2 x 5 Minuten) mit PBS-T wurde für 90 Minuten der Sekundärantikörper in 1% Milchpuffer auf dem Schüttler aufgetragen. Es folgten erneute Waschschrritte (3 x 10 Minuten und 3 x 5 Minuten) mit PBS-T. Anschließend wurde die Membran vorsichtig getrocknet und 1,5 ml enhanced Chemilumineszenz (ECL) - Lösung gleichmäßig aufgetragen. Bei der ECL-Reaktion entsteht, durch eine Oxidation von in der Lösung sich befindendem Luminol durch ein an den Antikörper gekoppeltes Enzym, Energie. Es kommt zur Freisetzung der Energie in Form von Licht. Das entstandene Licht schwärzt den in der Dunkelkammer aufgelegten Film und die detektierten Proteinbanden werden angezeigt. Die ECL-Lösung wurde für fünf Minuten abgedunkelt auf der Membran belassen, anschließend wurde die Membran in Folie in eine Filmkassette gelegt. In einer Dunkelkammer erfolgte die Belichtung des Films. Die Belichtungsdauer richtete sich hierbei nach der Stärke des Signals. Anschließend wurde der Film für je zwei Minuten in eine Entwicklerlösung und eine Fixierlösung gelegt. Dazwischen erfolgte ein zweiminütiger Waschgang in Aqua dest. Um im Verlauf weitere Proteine auf der PVDV-Membran zu untersuchen, musste die Membran gestrippt werden. Dies geschah mittels 20-minütiger Inkubation mit Re-Blot Plus Strong Stripping Solution und zwei Waschgängen mit PBS-T für je 10 Minuten. Nun konnte die Membran erneut für eine Stunde mit 5% Milchpuffer blockiert werden und ein neuer Primärantikörper konnte in 1% Milchpuffer über Nacht aufgetragen werden. Die verschiedenen Versuche wurden, wenn im Ergebnisteil bei der Abbildung mit dem jeweiligen Western Blot nicht anders vermerkt, mindestens dreimal durchgeführt, das heißt die Ergebnisse eines Versuchs wurden mindestens mit zwei weiteren unabhängigen Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen bestätigt.

2.5.6 7-methyl Guanosin triphosphat (m^7GTP) pull-down Assay

Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, konkurriert 4E-BP1 mit eIF-4G um die Bindung an eIF-4E. Wenn 4E-BP1 komplett phosphoryliert ist, bindet es nicht länger an eIF-4E. eIF-

4E wird freigesetzt und kann nun eIF-4G binden. Ein wichtiger Schritt zur Bildung des Translationsinitiationskomplexes ist getan.

Mithilfe des m^7 GTP pull-down Assays lässt sich der Translationsinitiationskomplex analysieren. Hierbei werden die Proteine 4E-BP1, eIF-4E und eIF-4G1 im Western Blot dargestellt.

Nach der 24-stündigen Behandlung der Zellen mit den Substanzen (detailliert siehe Abschnitt 2.2.5) wurden die Proteinlysate hergestellt. Hierzu wurden die behandelten Zellen bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in zwei Schritten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Lysepuffer A versetzt und die Proteinkonzentration wurde, wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben, bestimmt.

Die Zellysate für den Western Blot wurden aus 300 µg Protein und 50 µl des mRNA Kappen-Analogons m^7 GTP-Sepharose hergestellt und mit Puffer A auf ein Gesamtvolumen von 110 µl aufgefüllt. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Die Sepharose und die darangebundenen Proteine wurden durch drei Waschschriffe mit reinem Puffer A, das heißt ohne den Zusatz von 1% NP-40, bei 2000 rpm für acht Minuten gewonnen. Der dabei entstandene Überstand wurde jeweils verworfen. Nach den Waschschriffen wurde zu den Proben 20 µl mit 20% β -Mercaptoethanol zugesetztem Ladepuffer gegeben.

Im nächsten Schritt folgte die Denaturierung der Proteine durch zehninütiges Erhitzung auf 95°C, anschließende Abkühlung auf Eis und Zentrifugation bei 4°C und 1300 rpm für drei Minuten.

Die Geltaschen des vorbereiteten Gels, bestehend aus Sammelgel und 8%- oder 10%-igem Trenngel (detaillierter siehe Abschnitt 2.5.3), wurden mit je 15 µl der im Überstand vorhandenen ungebundenen Proteine befüllt. In die erste und letzte Tasche wurden je 7 µl Größenmarker gefüllt.

Die Durchführung der SDS-PAGE-Gelelektrophorese, des Western Blots und die Detektion der Proteine erfolgen wie in den Abschnitten 2.5.3, 2.5.4 und 2.5.5 beschrieben.

2.6 Statistische Analysen

Alle Experimente wurden, wenn nicht expizit im Ergebnisteil anders vermerkt, mindestens dreimal durchgeführt, das heißt die Ergebnisse eines Versuchs wurden mindestens mit zwei weiteren unabhängigen Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen

bestätigt. Die deskriptive Statistik wurde mittels Microsoft Office Excel 2017 berechnet. Die in den Diagrammen angegebenen Werte bestehen aus Mittelwerten, hieraus wurden Balken- und Liniendiagramme erstellt und die Standardabweichungen wurden als positive und negative Fehlerbalken dargestellt.

Das Signifikanzniveau wurde nach dem Student's T-Test für unabhängige Stichproben mit der Software SigmaStat berechnet. p-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen und durch (*) in den Abbildungen markiert.

3 Ergebnisse

3.1 PIM-Inhibitoren hemmen die Proliferation von DLBCL-Zelllinien

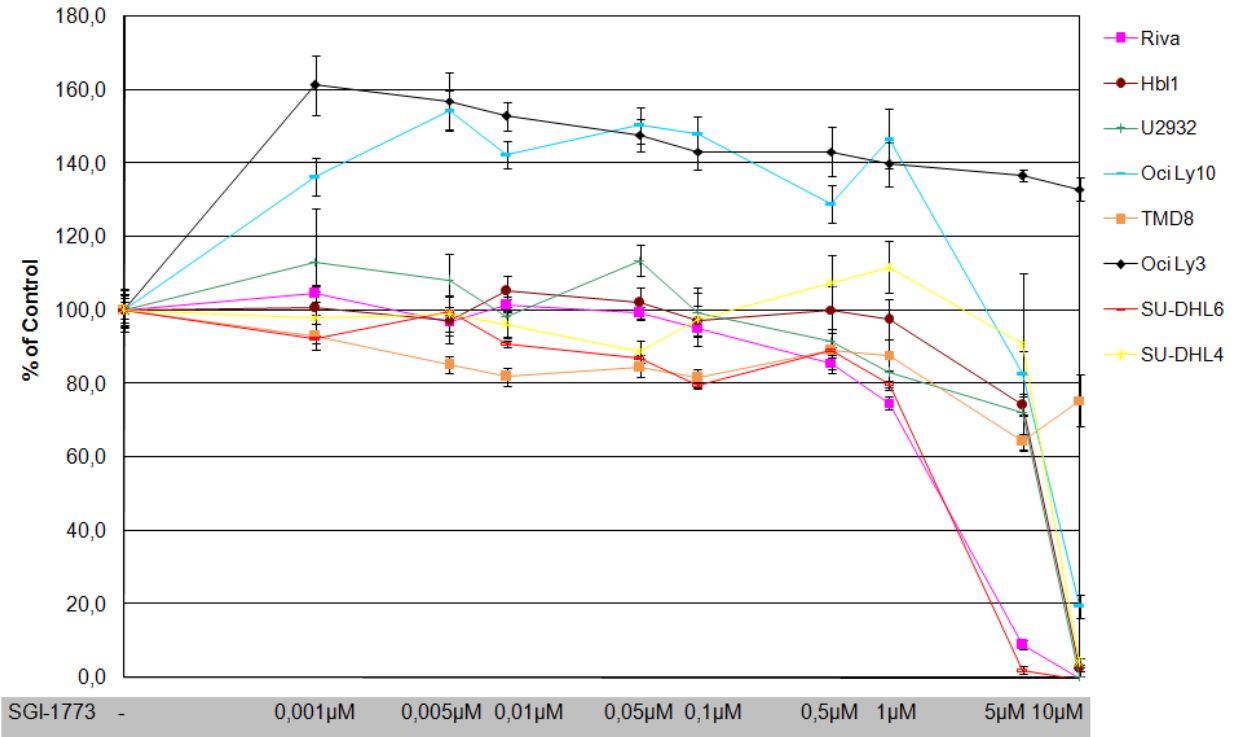
DLBCL-Zelllinien beider Subgruppen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der PIM-Inhibitoren SGI-1773, SGI-1776 und LGB321 behandelt. Nach 72 Stunden wurde die Zellviabilität mittels MTT-Test gemessen. Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen der PIM-Inhibitoren lagen im mikromolaren Bereich. SGI-1776 und SGI-1773 werden zu 95% an humane Plasmaproteine und in geringerem Ausmaß an FBS gebunden [81]. Somit führen die Konzentrationen zu nanomolaren Level in den Zellen.

Es wurden jedoch nicht alle unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung stehenden DLBCL-Zelllinien jeweils mit allen drei PIM-Inhibitoren getestet (siehe Tabelle 10). Dies lag zum Teil an der erschwerten Kultivierbarkeit mancher Zelllinien oder auch an mangelndem Ansprechen der Zelllinie auf die Inhibitoren. Je zwei GCB-Zelllinien (SU-DHL6, SU-DHL4) sowie zwei ABC-Zelllinien (Riva, HBL1) konnten jedoch mit allen drei PIM-Inhibitoren untersucht werden. Die weitergehenden Untersuchungen in dieser Arbeit erfolgten mit Zelllinien von beiden Subtypen, die sich problemlos kultivieren ließen und nicht gegen die Inhibitoren resistent waren.

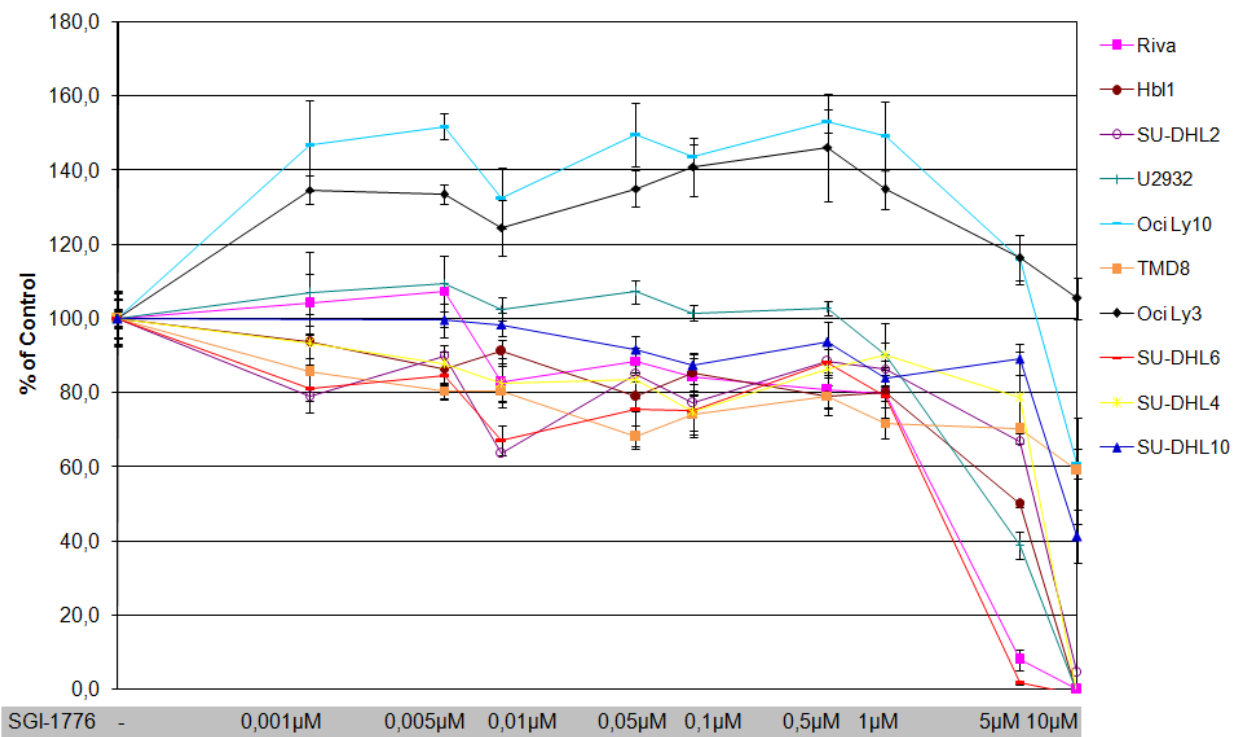
Es zeigte sich, dass die PIM-Inhibitoren konzentrationsabhängig zu einer verminderten Proliferation führen. Dies ließ sich über die Reduktion der Stoffwechselaktivität sowohl für GCB-Zelllinien (SU-DHL6, SU-DHL4, Toledo, SU-DHL10, Oci Ly2 und DB) als auch für ABC-Zelllinien (Riva, HBL1, SU-DHL2, U2932, Oci Ly10, TMD8 und Oci Ly3) nachweisen (siehe Abbildung 6 A, B, C). Allerdings zeigten sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität auf die verschiedenen PIM-Inhibitoren – wobei alle getesteten Zelllinien am sensibelsten auf den PIM-Inhibitor LGB321 reagierten - und zwischen den einzelnen Zelllinien (siehe Tabelle 10).

Bei den untersuchten Zelllinien, mit Ausnahme von Oci Ly10 und Oci Ly3, führten SGI-1773 und SGI-1776 erst ab Konzentrationen von 5 oder 10 μM , zu einer Reduktion der Proliferation (Abbildung 6 A, B). Oci Ly10 und Oci Ly3 waren resistent. Beide resistenten Zelllinien wiesen eine Zunahme der Stoffwechselaktivität unter der Behandlung mit SGI-1773 und SGI-1776 auf und sprachen nicht, wie im Fall von Oci Ly3, oder erst bei sehr hohen Konzentrationen ab 5 μM , wie bei Oci Ly10, auf die Inhibitoren an.

A



B



C

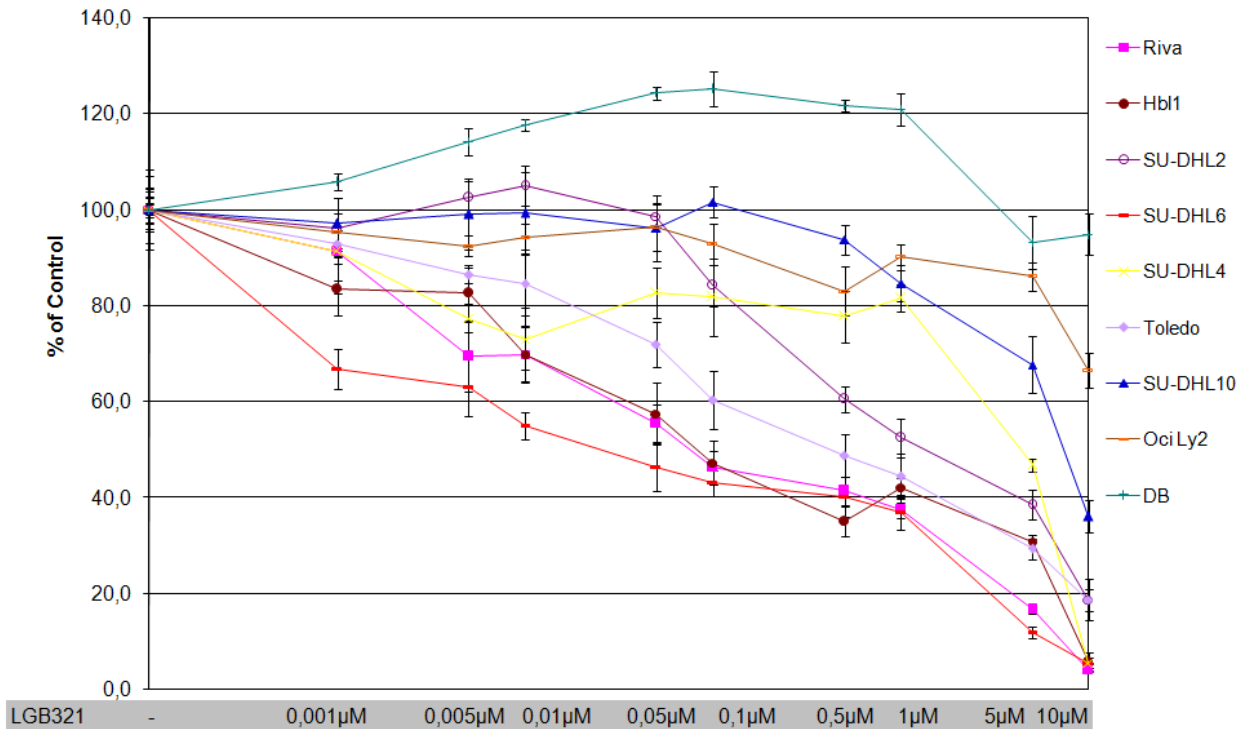


Abbildung 6: PIM-Inhibitoren führen zu Reduktion der Zellproliferation bei DLBCL-Zelllinien.

DLBCL-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen im Bereich zwischen 0,001 µM und 10 µM der PIM-Inhibitoren (A) SGI-1773, (B), SGI-1776 und (C) LGB321 behandelt. Nach 72 Stunden wurde die Proliferation mittels MTT-Test gemessen.

Interessanterweise ergab sich bei LGB321 ein anderes Bild (siehe Abbildung 6C). Hier wurde bei den getesteten Zelllinien, ausgenommen DB und Oci Ly2, schon bei geringerer Konzentration eine Proliferationshemmung erreicht. DB und Oci Ly2 zeigten sich partiell resistent gegenüber LGB321. Der IC₅₀ wurde bei diesen Zelllinien nicht erreicht und die Proliferation wurde maximal um 33,4% gesenkt. Da sich in meinen Untersuchungen bei den meisten getesteten Zelllinien mit LGB321 bereits eine Reduktion der Proliferation bei einer Konzentration ab 0,005 µM nachweisen ließ, fiel die Entscheidung den PIM-Inhibitor LGB321 für die weiteren Analysen in dieser Arbeit zu verwenden.

Tabelle 10: IC₅₀ und maximal erreichbare Inhibition der Proliferation durch Behandlung mit SGI-1773, SGI-1776 bzw. LGB321.

DLBCL-Zelllinien wurden 72 Stunden mit ansteigenden Konzentrationen zwischen 0,001 µM und 10 µM der PIM-Inhibitoren behandelt. Im Anschluss wurde die Proliferation mittels MTT-Test gemessen und der IC₅₀ berechnet. n.e. = keine Proliferationshemmung erreicht. - = Zelllinie nicht getestet.

Zelllinie	SGI-1773		SGI-1776		LGB321	
	IC ₅₀ (µM)	max. Inhibition mit 10 µM (%)	IC ₅₀ (µM)	max. Inhibition mit 10 µM (%)	IC ₅₀ (µM)	max. Inhibition mit 10 µM (%)
Riva	4,05	100	3,88	100	2,13	95,9
Hbl1	5,79	97,4	4,45	100	2,52	93,8
SU-DHL2	-	-	5,02	95,3	4,9	81,2

U2932	5,58	99,7	-	-	-	-
Oci Ly10	7,63	80,6	> 10	39,1	-	-
TMD8	> 10	24,5	> 10	41	-	-
Oci Ly3	> 10	n.e.	> 10	n.e.	-	-
SU-DHL6	3,71	100	3,24	100	1,16	94,4
SU-DHL4	6,5	96	5,23	100	4,45	94,4
Toledo	-	-	-	-	3,76	81,2
SU-DHL10	-	-	9,95	58,7	7,73	63,8
Oci Ly2	-	-	-	-	> 10	33,4
DB	-	-	-	-	> 10	5

Zusammenfassend erwiesen sich die ABC-Zelllinien Riva, Hbl1, SU-DHL2 und U2932 und die GCB-Zelllinien SU-DHL6 und SU-DHL4 als sensibel auf PIM-Inhibitoren mit nahezu 100%iger Inhibition der Proliferation. Die ABC-Zelllinie Oci Ly3 zeigte eine Zunahme der Zellproliferation unter der Behandlung mit PIM-Inhibitoren.

3.2 Der PIM-Inhibitor LGB321 führt in Kombination mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 und dem anti-CD20-Antikörper Rituximab zu verstärkten Effekten auf die Proliferationshemmung

Da der mTORC1-, der PIM- und der MAP-ERK- Signalweg miteinander über eine gemeinsame Endstrecke bei der Regulation der cap-abhängigen mRNA-Translation interagieren, wurde untersucht, ob der kombinierte Einsatz von mTORC1- und PIM-Inhibitoren und Rituximab, was in diesem Modell in Hinblick auf seine Inhibitoreigenschaften auf den MAP-ERK-Signalweg untersucht wurde, zu verstärkenden Effekten auf die Proliferationshemmung führt.

3.2.1 Wirkung des mTOR-Inhibitors RAD001 auf die Proliferation

Wie bereits publizierte Arbeiten auch aus unserem Labor zeigen [132], werden DLBCL-Zelllinien durch eine Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen des mTOR-Inhibitors RAD001 in ihrem Wachstum gehemmt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten wir für die untersuchten Zelllinien eine dosisabhängige Proliferationshemmung bestätigen (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Wirkung des anti-CD20-Antikörpers Rituximab auf die Proliferation

Die Wirkung des anti-CD20-Antikörpers Rituximab auf das Wachstum einiger DLBCL-Zelllinien wurde konzentrationsabhängig mittels MTT-Test nach 72 Stunden untersucht. Die ABC-Zelllinien Riva und HBL1 zeigten ab einer Konzentration von 1 µg/ml eine stärkere Wachstumshemmung als die untersuchten GCB-Zelllinien DB, Oci Ly2 und Toledo. Die GCB-Zelllinie SU-DHL4 wich von diesem Muster ab und reagierte am sensibelsten mit einer Hemmung der Proliferation von 50,9% auf Rituximab (siehe

Abbildung 7). Insgesamt lies sich mit Rituximab in den eingesetzten Konzentrationen jedoch nur eine sehr moderate Wirkung erzielen.

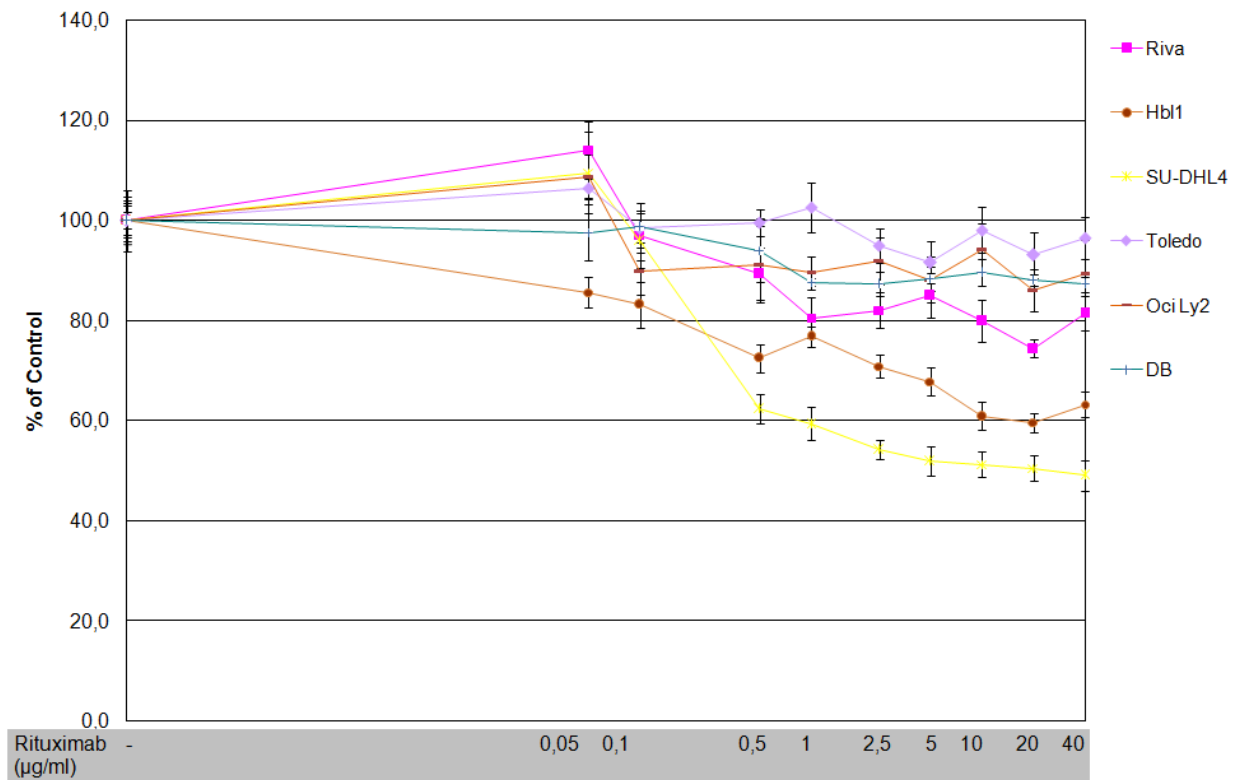


Abbildung 7: Der monoklonalen anti-CD20-Antikörpers Rituximab führt zur Reduktion der Zellproliferation bei DLBCL-Zelllinien.

DLBCL-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen im Bereich zwischen 0,05 µM und 40 µM mit dem anti-CD20-Antikörpers Rituximab behandelt. Nach 72 Stunden wurde die Proliferation mittels MTT-Test gemessen.

3.2.3 Kombination der PIM-Inhibitoren SGI-1176 und LGB321 mit RAD001 und Rituximab

Um herauszufinden, ob sich die Wirksamkeit der einzelnen Substanzen auf die Proliferationshemmung steigern lässt, wurden die PIM-Inhibitoren mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 und dem CD20-Antikörper Rituximab kombiniert. Je zwei ABC-Zelllinien (Riva und Hbl1) und zwei GCB-Zelllinien (Oci Ly2 und SU-DHL4) wurden mit einem PIM-Inhibitor, SGI-1776 und LGB321, RAD001 und Rituximab einzeln und in Kombination behandelt. Nach 72 Stunden wurde die Viabilität ermittelt. Die Entscheidung für die ausgewählten Zelllinien fiel zum einen aufgrund ihrer einfachen Handhabung in der Zellkultur, andererseits reagierten sie in den zuvor durchgeführten Proliferationstest mit den einzelnen Inhibitoren sensibel (siehe Tabelle 10).

Der Versuchsansatz mit SGI-1776 zeigte bereits bei der Zweifach-Kombination mit RAD001 bei allen untersuchten Zelllinien kaum Kombinationseffekte (siehe Abbildung 8). RAD001 führte bei allen getesteten Zelllinien effektiver zu einer

Proliferationshemmung als SGI-1776. Auf eine Kombination der beiden Inhibitoren reagierten die Zelllinien nur gering. Bei den Zelllinien Riva, Hbl1 und Oci Ly2 ließ sich eine weitere Abnahme der Proliferation um 10% erkennen. SU-DHL4 reagierte nicht auf die Kombination der beiden Substanzen, hier wurde die durch RAD001 erreichte Inhibition durch die zusätzliche Gabe von SGI-1776 nicht verändert.

Da sich bei diesem Versuchsansatz durch die Zweifach-Kombination aus SGI-1776 und RAD001 kaum zusätzliche Effekte auf die Proliferation ergaben, wurden keine Versuche mit der Dreifach-Kombination aus SGI-1776, RAD001 und Rituximab durchgeführt.

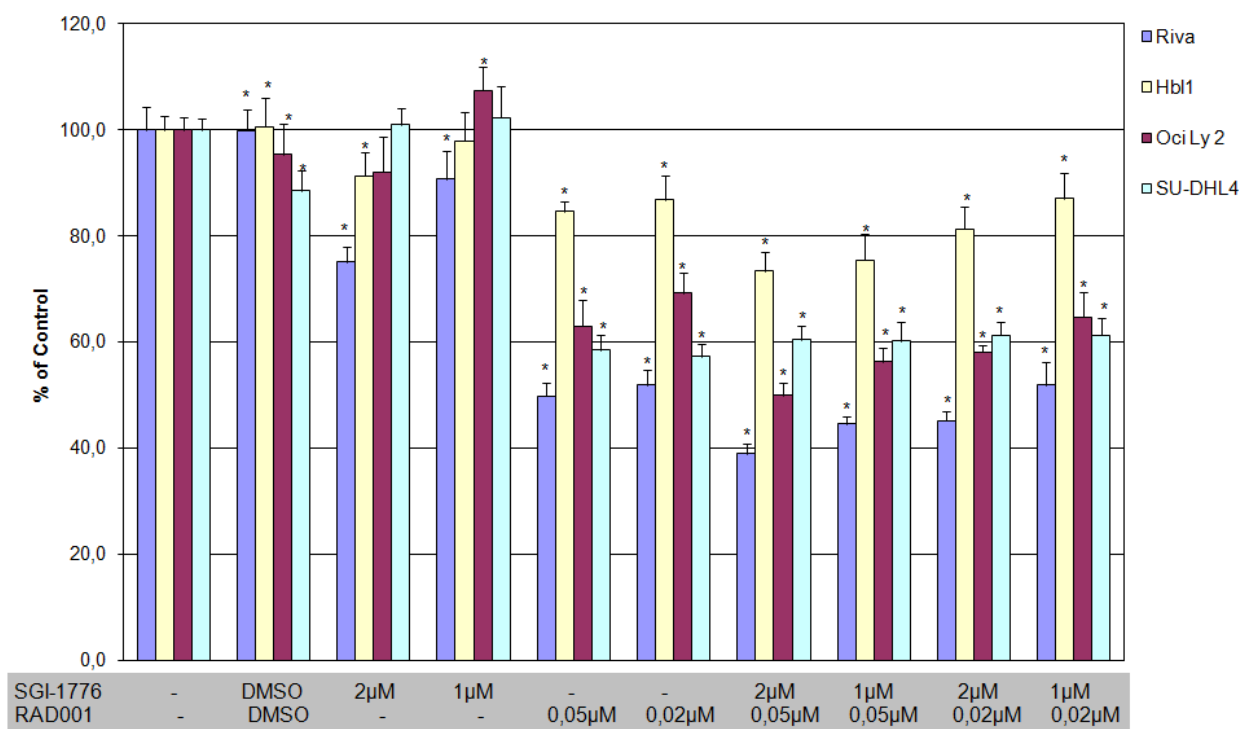


Abbildung 8: Die Kombination des PIM-Inhibitors SGI-1776 mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 zeigt kaum Kombinationseffekte auf die Zellproliferation bei DLBCL-Zelllinien.

DLBCL-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen mit dem PIM-Inhibitor SGI-1776 und dem mTOR-Inhibitor RAD001 einzeln und in Kombination behandelt. Nach 72 Stunden wurde die Proliferation mittels MTT-Test gemessen. *p < 0,05 gegenüber der Kontrollprobe.

Im Vergleich der beiden eingesetzten PIM-Inhibitoren erwies sich LGB321 wirkungsvoller als SGI-1776. LGB321 führte bereits bei der Kombination mit RAD001 zu einem verstärkten Effekt auf die Proliferationshemmung (siehe Abbildung 9). Die Ergebnisse der Kombination von LGB321 und RAD001 zeigten eine zusätzliche Abnahme der Proliferation bei allen untersuchten Zelllinien um 15-20% ohne einen Unterschied zwischen den Subgruppen ABC und GCB. Unterschiede zwischen den Subgruppen ließen sich erst bei der Dreifach-Kombination mit Rituximab erkennen. Bei den ABC-Zelllinien Riva und Hbl1 ergab die Kombination der drei Substanzen eine Proliferationshemmung, die stärker war als die einer

Zweifach-Kombination. Ein wesentlicher Unterschied bei der Proliferationshemmung zwischen einer Behandlung mit LGB321 und RAD001, LGB321 und Rituximab oder RAD001 und Rituximab zeigte sich nicht.

Bei den GCB-Zelllinien ergab sich ein anderes Bild. Bei SU-DHL4 schien die Dreifach-Kombination nur minimal wirksamer als eine Zweifach-Kombination aus RAD001 und Rituximab. OciLy2 zeigte keine weitere Abnahme des Zellwachstums nach einer Dreifach-Behandlung (40,6%) im Gegensatz zu einer Zweifach-Kombination aus LGB321 und RAD001 (35,5%).

Bei der Kombination mehrerer Substanzen muss die zytotoxische Wirkung der Substanzen auf die Zellen bedacht werden. Durch den Einsatz von zehnfach niedrigeren Konzentrationen von LGB321 und RAD001 und weiterhin sichtbarer Kombinationseffekte konnte die zytotoxische Wirkung als Erklärungsmodell für die gezeigten verstärkten Effekte auf die Proliferationshemmung abgeschwächt werden (Daten nicht gezeigt).

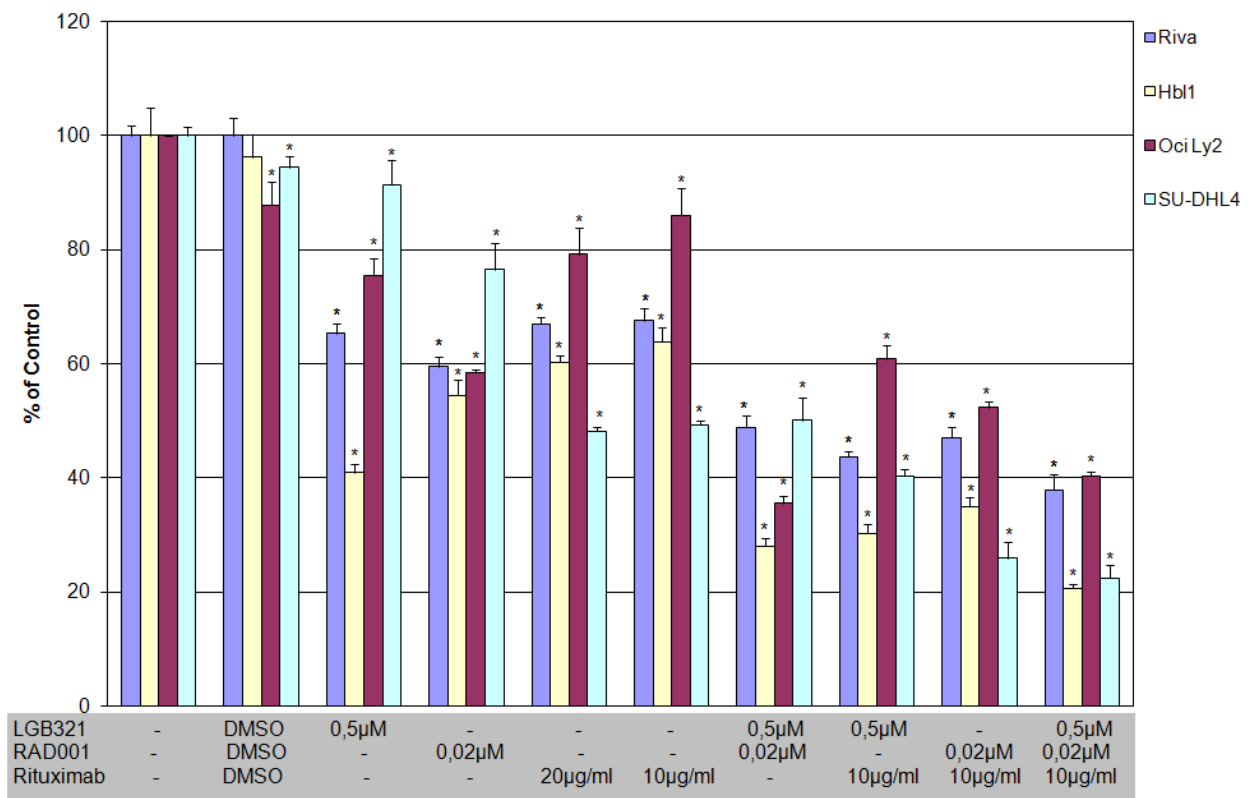


Abbildung 9: Die Behandlung mit dem PIM-Inhibitor LGB321, mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 und mit dem anti-CD20-Antikörper Rituximab zeigt Kombinationseffekte auf die Zellproliferation bei DLBCL-Zelllinien.

Die Zelllinien wurden mit den angegebenen Konzentrationen von LGB321, RAD001 und Rituximab für 72 Stunden kultiviert und im Anschluss wurde die Proliferation mittels MTT-Test gemessen. * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollprobe.

Ein ähnliches Bild mit der stärksten Proliferationshemmung beim Einsatz der Dreifach-Kombination zeigte sich auch bei dem Versuch primäre Zellen eines Patienten mit DLBCL für 72 Stunden mit Rituximab, RAD001 und LGB321 einzeln und in Kombination zu behandeln (siehe Abbildung 10). Allerdings wurde hier die Konzentration von RAD001 auf 0,1 µM erhöht, da Voruntersuchungen ergaben, dass primäre Zellen nicht so sensitiv auf RAD001 reagierten wie die untersuchten Zelllinien. Somit wurde die Entscheidung für die Verwendung von 0,1 µM RAD001 bei der Behandlung von primären Zellen getroffen. Die Konzentrationen für Rituximab und LGB321 wurden gleich belassen wie bei den Experimenten mit den Zelllinien. Die Viabilität lag:

- nach der Dreifach-Kombination bei 40,2%
- nach der Zweifach-Kombination mit LGB321 und RAD001 bei 52,2% und mit LGB321 und Rituximab bei 61,7%
- und für die einzelnen Substanzen bei 78,7% (LGB321), 64,2% (RAD001) und 70,8% (Rituximab).

Das Ergebnis des Zellproliferationsassays mit primären Zellen konnte aufgrund sich *in vitro* nicht längerfristig kultivierbarer Zellen nicht mit der gleichen Zellprobe mehrfach bestätigt werden.

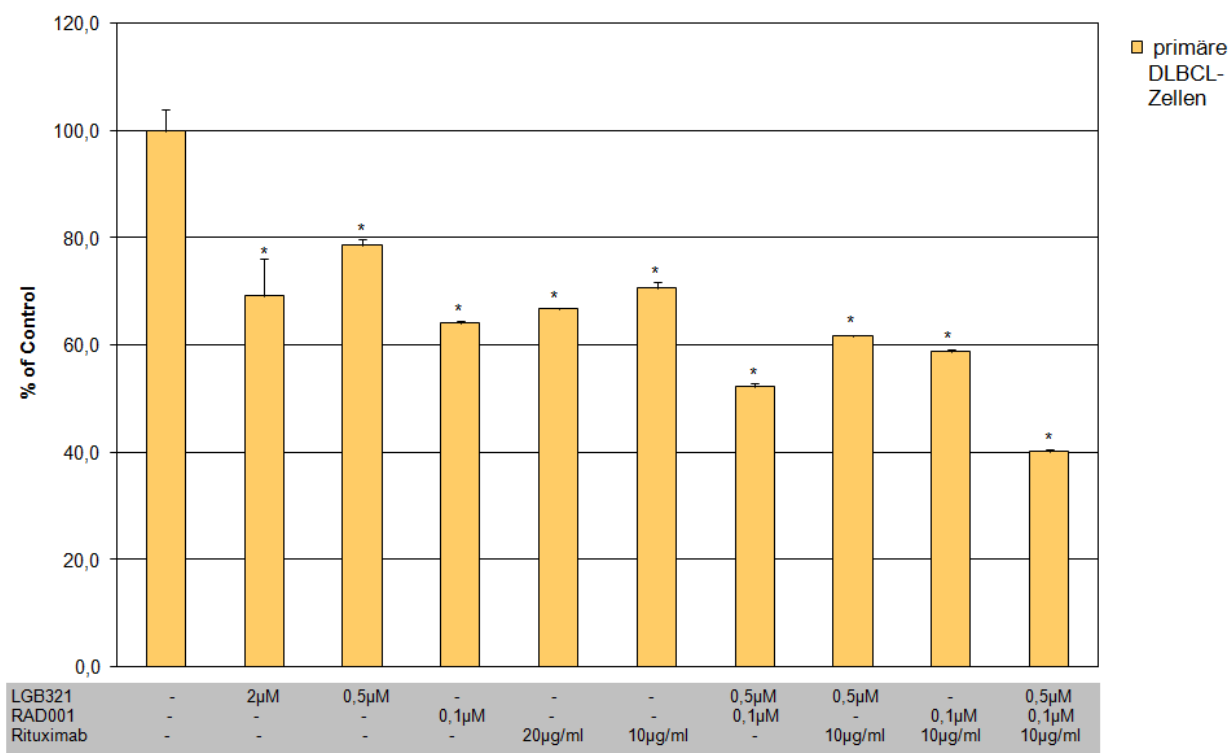


Abbildung 10: Die Behandlung mit dem PIM-Inhibitor LGB321, mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 und mit dem anti-CD20-Antikörper Rituximab zeigt Kombinationseffekte auf die Zellproliferation primärer DLBCL-Zellen.

Primäre Zellen eines Patienten mit DLBCL wurden aus einem Lymphknoten extrahiert, mit den angegebenen Konzentrationen der Substanzen für 72 Stunden kultiviert und im Anschluss wurde die Proliferation mittels MTT-Test gemessen. * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollprobe.

3.3 Zellzyklusarrest in der G₁-Phase und vermehrter Zelltod als Erklärung für die Proliferationshemmung?

Mit Hilfe von FACS-Analysen wurden die Ursachen der beschriebenen Viabilitätsreduktion bei DLBCL-Zellen durch LGB321, RAD001 und Rituximab untersucht. Dabei wurde bestimmt in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zelle befindet. Je eine ABC-Zelllinie (Riva) und je eine GCB-Zelllinie (SU-DHL4) wurde 72 Stunden mit den drei Substanzen behandelt, anschließend wurde die DNA in den Zellen mit PI gefärbt und durchflusszytometrisch wurde der DNA-Gehalt gemessen. So ließen sich Rückschlüsse auf den Zellzyklus ziehen.

Der prozentuale Anteil der unbehandelten Zellen der Kontrollprobe, welche sich nach 72 Stunden in der G₁-Phase befand, lag bei Riva bei etwa 45% und bei SU-DHL4 bei etwa 43% (siehe Tabelle 11).

Bei Riva, einer ABC-Zelllinie, stieg der Anteil der Zellen in der G₁-Phase bei der Einfach-Behandlung mit LGB321, RAD001 oder mit Rituximab im Vergleich zu den Kontroll-Zellen nur gering an. Es zeigte sich aber auch bei den Zellen, die mit der Zweifach- oder Dreifach-Kombinationen behandelt wurden, kein relevanter Anstieg an Zellen in der G₁-Phase. Auch bei der Dreifachkombination aus LGB321, RAD001 und Rituximab lag der G₁-Phasen-Anteil nur bei 49,78% (siehe Tabelle 11).

Bei der GCB-Zelllinie SU-DHL4 hingegen zeigte sich der Effekt von RAD001 auf die Zellen. Es kam zu einem Zellzyklusarrest in der G₁-Phase. Am stärksten ausgeprägt war der G₁-Phasen-Arrest bei der Dreifachkombination mit 67,54% im Vergleich zur Kontrollprobe (43,06%). Parallel dazu sank der Anteil der Zellen in der S-Phase von 34,83% auf 10,31% (siehe Tabelle 11B). Sowohl Riva als auch SU-DHL4 wiesen einen steigenden Anteil an Zellen mit hypodiploidem Zellkern, das heißt toten Zellen, unter der Behandlung mit den Substanzen auf. Bei SU-DHL4 war die Zunahme der toten Zellen deutlich sichtbar beim Einsatz von Rituximab. Bestärkt wurde diese Erkenntnis auch durch die Ergebnisse der unabhängig von diesem Versuch durchgeführten Western Blot Analysen zur Apoptoseinduktion (siehe Abbildung 12B und Abbildung 13B).

Tabelle 11: Der PIM-Inhibitor LGB321, der mTOR-Inhibitor RAD001 und der monoklonale anti-CD20-Antikörper Rituximab führen in den DLBCL-Zelllinien zu einem vermehrten Zelltod und zusätzlich bei SU-DHL4 zu einem G₁-Phasen-Arrest.

Die Zellen (A) der ABC-Zelllinie Riva und (B) der GCB-Zelllinie SU-DHL4 wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Substanzen für 72 Stunden kultiviert, im Anschluss wurde der DNA-Gehalt durchflusszytometrisch gemessen.

A Riva

	tote Zellen (%)	G ₁ -Phase (%)	S-Phase (%)	G ₂ -Phase (%)
Kontrolle	6,76	45,65	35,62	12,96
LGB321 0,5 µM	8,14	49,25	34,31	9,29
RAD001 0,02 µM	9,02	48,08	32,05	11,89
Rituximab 10 µg/ml	11,07	45,93	34,88	8,77
RAD001+LGB321	12,18	46,61	32,42	9,46
Rituximab+LGB321	12,89	45,86	31,01	10,72
Rituximab+RAD001	10,31	50,84	30,46	8,96
Rituximab+RAD+LGB321	15,13	49,78	26,47	8,85

B SU-DHL4

	tote Zellen (%)	G ₁ -Phase (%)	S-Phase (%)	G ₂ -Phase (%)
Kontrolle	3,91	43,06	34,83	19,61
LGB321 0,5 µM	2,71	46,97	32,04	19,55
RAD001 0,02 µM	3,73	57,97	24,05	14,2
Rituximab 10 µg/ml	15,62	42,16	30,69	12,78
RAD001+LGB321	5,84	63,86	22,54	8,82
Rituximab+LGB321	10,56	47,99	28,75	14,21
Rituximab+RAD001	15,49	66,01	11,08	6,98
Rituximab+RAD+LGB	16,6	67,54	10,31	5,76

3.4 Schutzmechanismus Autophagie als Erklärung für die Proliferationshemmung?

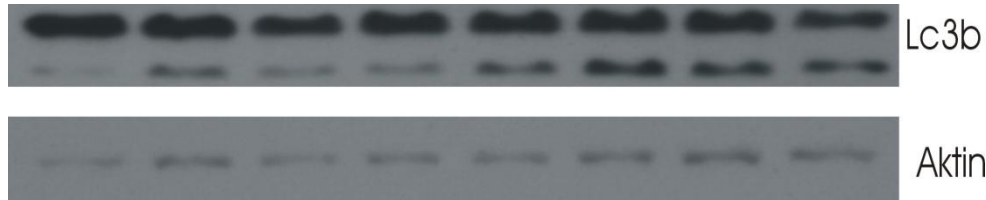
Um weitere Erkenntnisse über die Gründe, die zur Abnahme der Zellproliferation führten, zu erlangen, wurden die Zellen auf Autophagie untersucht. Die Zellen wurden auf den Autophagiemarker Lc3b (auch Lc3-II genannt) analysiert.

Riva und SU-DHL4 wurden mit LGB321, RAD001 und Rituximab einzeln und in Kombination für 48 Stunden behandelt, anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot auf die Spaltung von Lc3 hin zu Lc3b untersucht. β -Aktin diente als Ladungskontrolle. Das Entstehen des 16kDa schweren Spaltprodukts des Lc3, also das Lc3b, deutet auf die Bildung von Autophagosomen in der Zelle hin. Unterschiede in der Darstellung der Ergebnisse ergeben sich durch die Verwendung von 10%igem Trenngel in Abbildung 11A und 8%igem Trenngel in Abbildung 11B.

Sowohl bei Riva als auch bei SU-DHL4 konnte das Spaltprodukt bereits in der Kontrolle nachgewiesen werden und deutet auf vorhandene Autophagie hin.

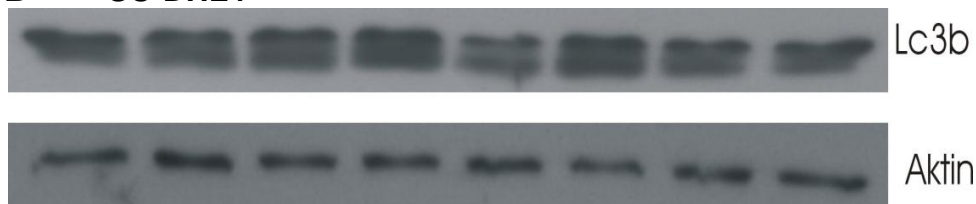
Bei Riva zeigte sich, dass bei Zellen, die mit LGB321 behandelt wurden, das Spaltprodukt vermehrt entsteht. Eine leichte Zunahme des Spaltprodukts war bei der Verwendung mehrerer Substanzen nachweisbar. Die leichte Zunahme des Spaltprodukts wurde beim Einsatz von jeweils zwei Substanzen beobachtet, stieg aber nicht beim Einsatz von drei Substanzen (siehe Abbildung 11A).

A Riva



-	+	-	-	+	+	-	+	LGB321 0,5 µM
-	-	+	-	+	-	+	+	RAD001 0,02 µM
-	-	-	+	-	+	+	+	Rituximab 10 µg/ml

B SU-DHL4



-	+	-	-	+	+	-	+	LGB321 0,5 µM
-	-	+	-	+	-	+	+	RAD001 0,02 µM
-	-	-	+	-	+	+	+	Rituximab 10 µg/ml

Abbildung 11: Die DLBCL-Zelllinien zeigen bereits unbehandelt eine Proteinexpression des Autophagiemarkers LC3b. Die Menge des Spaltprodukts wird bei der Riva durch die Behandlung mit dem PIM-Inhibitor LGB321 gesteigert.

(A) ABC-Zelllinie Riva und (B) GCB-Zelllinie SU-DHL4 wurden nach 48-stündiger Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen der Substanzen lysiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die Bildung von LC3b untersucht. β -Aktin diente als Ladungskontrolle.

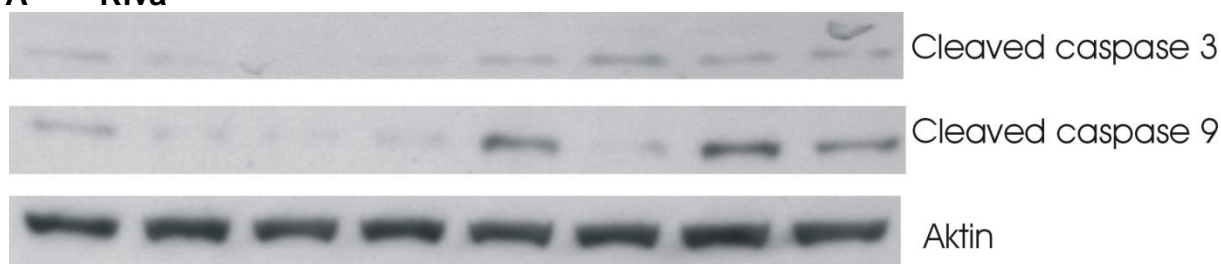
Im Gegensatz hierzu wurde bei SU-DHL4 nur beim Einsatz von Rituximab und Rituximab mit LGB321 eine geringgradige Veränderung der Spaltproduktmenge beobachtet (siehe Abbildung 11B).

3.5 Apoptose als Erklärung für die Proliferationshemmung?

Um herauszufinden, ob die beobachtete Proliferationshemmung durch vermehrte Apoptose der Zellen zustande kam, wurden die Zelllinien Riva und SU-DHL4 mit

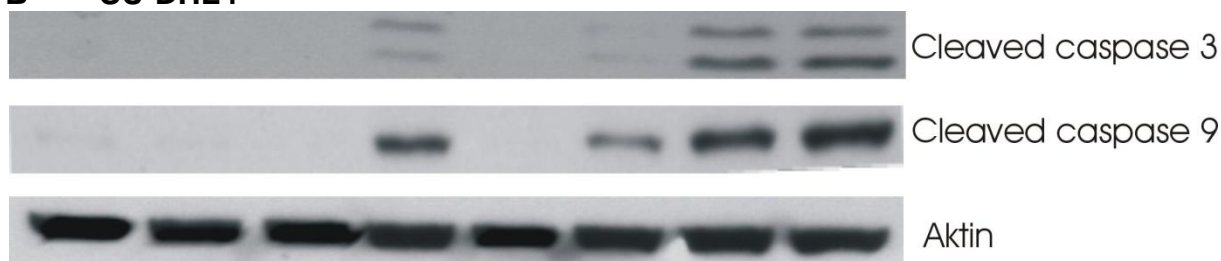
LGB321, RAD001 und Rituximab einzeln und in Kombination für 48 Stunden behandelt, anschließend lysiert und mittels Western Blot auf die Spaltung der Caspasen 3 und 9 untersucht. Zur Kontrolle der Beladung wurde β -Aktin verwendet. Die nachfolgenden Western Blot Analysen der Caspasen- und Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)-Spaltung wurden zweimal durchgeführt, das heißt die Ergebnisse eines Versuchs wurden mit einem weiteren unabhängigen Versuch mit ähnlichen Ergebnissen bestätigt. Bei Riva (siehe Abbildung 12A) zeigte sich, dass die Behandlung mit den einzelnen Substanzen zu keiner Veränderung in der Spaltung der Caspasen führte. Die Kombination von zwei oder drei Substanzen induzierte jedoch eine Spaltung der Caspase 3 und der Caspase 9 und man sah im Vergleich zu den Einzelsubstanzen bei allen Kombinationen eine stärkere Spaltung der Caspasen. Diese Ergebnisse korrelierten größtenteils mit den bei der Zellzyklusanalyse in Tabelle 11A gezeigten Werten mit der prozentualen Zunahme der toten Zellen bei Kombination der Substanzen.

A Riva



-	+	-	-	+	+	-	+	LGB321 0,5 μM
-	-	+	-	+	-	+	+	RAD001 0,02 μM
-	-	-	+	-	+	+	+	Rituximab 10 μg/ml

B SU-DHL4



-	+	-	-	+	+	-	+	LGB321 0,5 μM
-	-	+	-	+	-	+	+	RAD001 0,02 μM
-	-	-	+	-	+	+	+	Rituximab

								10 µg/ml
--	--	--	--	--	--	--	--	-----------------

Abbildung 12: Die Behandlung mit der Kombination von LGB321, RAD001 und Rituximab führt zu einer Spaltung der Caspasen 3 und 9 bei DLBCL-Zelllinien.

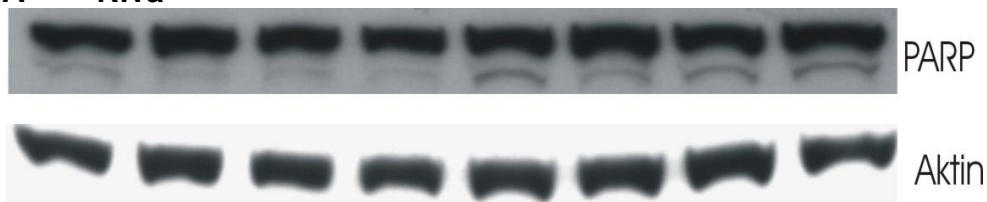
A) Riva und (B) SU-DHL4 wurden nach 48-stündiger Inkubation mit LGB321, RAD001 und Rituximab einzeln und in Kombination auf die Spaltprodukte der Caspasen 3 und 9 mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. β-Aktin diente als Beladungskontrolle.

SU-DHL4 (siehe Abbildung 12B) wies, wie Riva auch, keine Caspasenspaltung bei der Behandlung mit LGB321 oder RAD001 einzeln auf. Es zeigte sich aber bei SU-DHL4 deutlich, dass es vor allem bei der Behandlung mit Rituximab zu einem vermehrten Gehalt des Spaltprodukts der Caspasen kam. Dies betraf sowohl die Einzelbehandlung als auch die Zwei- und Dreifach-Behandlung. Durch die Behandlung mit Rituximab ließ sich bei SU-DHL4 die Menge des Spaltprodukts steigern. Hingegen induzierten LGB321 und RAD001 gemeinsam keine Spaltung der Caspasen 3 und 9. Auch bei SU-DHL4 korrelierten die Ergebnisse der Western Blot Analyse mit denen der Zellzyklusanalyse (siehe Tabelle 11B).

Um die gezeigten Ergebnisse der Apoptoseinduktion über eine Caspasenspaltung zu bestätigen, erfolgte die Analyse der PARP-Spaltung. Die Spaltung von PARP weist auf stattfindende Apoptose hin und ergibt einen indirekten Nachweis der Caspase 3 - Aktivität in den Zellen. Zur Untersuchung der PARP-Spaltung wurden die Zelllinien Riva und SU-DHL4 für 48 Stunden mit LGB321, RAD001 und Rituximab einzeln und in Kombination inkubiert. Nach der Lyse der Zellen erfolgte die Analyse mittels Western Blot. Als Ladungskontrolle wurde β-Aktin verwendet.

Bei Riva (siehe Abbildung 13A) zeigte sich eine Spaltung von PARP bei der Kombination der Substanzen. Dabei lies sich aber zwischen Zellen, die mit zwei oder drei Substanzen behandelt wurden, keinen Unterschied in der Stärke des Spaltproduktes erkennen.

A Riva



-	+	-	-	+	+	-	+	LGB321 0,5 µM
-	-	+	-	+	-	+	+	RAD001 0,02 µM
-	-	-	+	-	+	+	+	Rituximab 10 µg/ml



-	+	-	-	+	+	-	+	LGB321 0,5 μM
-	-	+	-	+	-	+	+	RAD001 0,02 μM
-	-	-	+	-	+	+	+	Rituximab 10 μg/ml

Abbildung 13: Durch die Behandlung mit LGB321, RAD001 und Rituximab in Kombination kommt es bei (A) Riva zu PARP- Spaltung. (B) SU-DHL4 zeigt PARP-Spaltung bei der Behandlung mit Rituximab.

(A) Riva und (B) SU-DHL4 wurden nach 48-stündiger Inkubation mit LGB321, RAD001 und Rituximab einzeln und in Kombination auf die Spaltung von PARP mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

Bei SU-DHL4 (siehe Abbildung 13B) ergab sich immer dann eine Bildung des Spaltproduktes wenn die Zellen mit Rituximab behandelt wurden. Eine Kombination der Inhibitoren mit Rituximab führte aber zu keinem erhöhten Gehalt an gespaltenem PARP als die alleinige Behandlung mit Rituximab. Beim Einsatz von LGB321 und RAD001 gemeinsam ließ sich keine PARP-Spaltung darstellen. Die mit dem Einsatz von Rituximab aufgetretene Apoptoseinduktion ließ sich bei SU-DHL4 sowohl bei der Caspasen - als auch bei der PARP - Spaltung nachweisen und korrelierte mit den Ergebnissen der Zellzyklusanalyse (siehe Tabelle 11B).

3.6 Auswirkungen der Substanzen auf den PI3-Kinase/AKT/mTOR-Signalweg, den PIM-Signalweg und den ERK-Signalweg

3.6.1 Nachweis von Schlüsselproteinen

Um die molekularen Mechanismen, durch welche die Proliferationshemmung, der vermehrte Zelltod und der Zellzyklusarrest mit den Substanzen erreicht werden, zu verstehen, wurden wichtige Proteine des PIM-Signalwegs und Proteine, die sowohl durch den PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, den PIM-Signalweg und den MAP-ERK-Signalweg beeinflusst werden, untersucht. Außerdem wurde die Expression von p44/42 (auch ERK 1/2 genannt) untersucht, da Rituximab seine direkte Wirkung unter anderem über die Hemmung des MAP-ERK-Signalwegs vermittelt [55].

Zunächst wurde das Vorhandensein dieser Proteine bei den DLBCL-Zelllinien analysiert. Dazu wurden unbehandelte Zellen lysiert. Mittels Western Blot konnten die Proteine dargestellt werden. Als Ladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet. Es wurde

ein breites Spektrum an DLBCL – Zelllinien untersucht. Dabei wurden sowohl GCB-Zelllinien wie OciLy2, SU-DHL4, DB und Toledo, als auch ABC-Zelllinien, wie SU-DHL2, Riva und Hbl1, eingesetzt (siehe Abbildung 14).

PIM-1 liegt in zwei Isoformen und PIM-2 in drei Isoformen vor [60]. Alle untersuchten ABC-Zelllinien bestätigten in der Western Blot Analyse die publizierte Beobachtung, dass die PIM-Kinasen PIM-1 und PIM-2 bei dem ABC-Subtyp eine sehr starke Expression aufweisen [19]. Bei dem GCB-Subtyp fielen Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien auf. Vorallem die GCB-Zelllinien SU-DHL4 und OciLy 2 wiesen eine schwache Expression von PIM-1 und PIM-2 auf, während bei DB und Toledo eine stärkere Expression nachgewiesen wurde. Keinen Unterschied zeigte sich hingegen bei der Expression von PIM-3. PIM-3 wurde bei allen untersuchten Zelllinien stark exprimiert. Man sah bei den ABC-Zelllinien deutlich die Auswirkungen einer starken PIM-Expression auf die Phosphorylierung von Bad. pBad wurde hier stark exprimiert. PIM führt zu einer inaktivierenden Phosphorylierung von Bad und hemmt hierdurch apoptotischen Zelltod [61]. Bei den GCB-Zelllinien zeigte sich eine schwächere Phosphorylierung von Bad als bei den untersuchten ABC-Zelllinien.

Durch die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs kommt es durch mTORC1 zu einer Phosphorylierung von 4E-BP1 und gleichzeitigen Freisetzung von eIF-4E [100]. In allen untersuchten Zelllinien konnte die Expression von p4E-BP1 und eIF-4E gezeigt werden, wobei die beiden ABC-Zelllinien Riva und Hbl1 und die GCB-Zelllinie OciLy 2 im Vergleich mit den anderen Zelllinien die Proteine schwächer exprimierten.

Die untersuchten Proteine werden aber sowohl durch den PI3K/AKT/mTOR–Signalweg, den PIM-Signalweg als auch durch den MAP-ERK-Signalweg beeinflusst. Eine Überexpression von PIM führt dazu, dass 4E-BP1 durch Phosphorylierung gehemmt wird [77]. Freigesetztes phosphoryliertes eIF-4E fördert die cap-abhängige mRNA-Translation. Es entstehen nun unter anderem die Proteine Mcl-1 und c-Myc, welche zum Zellüberleben führen. Bei der Analyse der Proteinexpression ließen sich bei allen untersuchten Zelllinien Mcl-1 und c-Myc nachweisen. Bei den ABC-Zelllinien bestand nur bei Riva eine schwache Expression von c-Myc. Die GCB-Zelllinie OciLy 2 wies, wie sich schon durch die zuvor erwähnte schwache Expression von pEIF-4E vermuten ließ, auch nur schwache Banden in der Western Blot Analyse bei Mcl-1 und c-Myc auf.

Bei der Expression von ERK1/2 (p44/42) zeigten sich keine gravierenden Unterschiede zwischen den beiden DLBCL-Subgruppen. Allerdings fiel bei der Analyse der phosphorylierten und aktivierten Form von ERK1/2, p-p44/42, auf, dass bei allen

untersuchten ABC-Zelllinien mehr p-p44/42 exprimiert wurde als bei den GCB-Zellen. Vorallem Hbl1 zeigte ein sehr starkes Signal. Die Expression von p-p44/42 war bei den GCB-Zelllinien, mit Ausnahme von SU-DHL4, schwächer ausgeprägt.

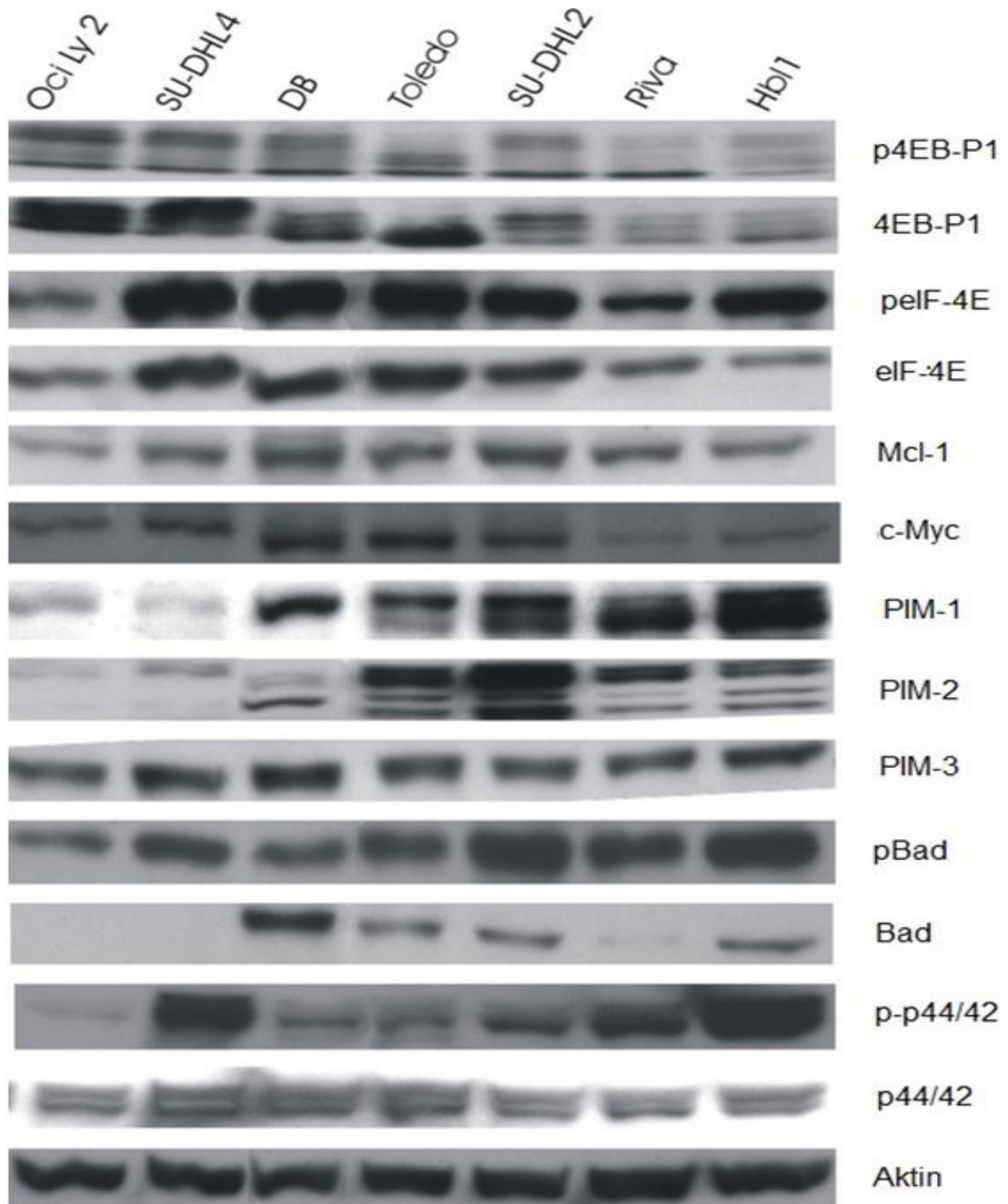


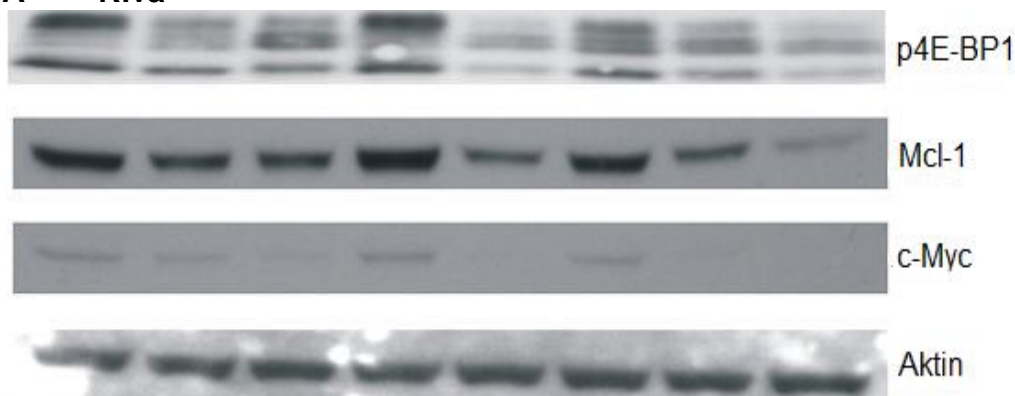
Abbildung 14: Schlüsselproteine des PI3-Kinase-/AKT-/mTOR-Signalwegs und des PIM-Signalwegs sowie die Expression von ERK1/2 bei unbehandelte DLBCL-Zelllinien.

3.6.2 Herunterregulation der Schlüsselproteine

Im nächsten Schritt wurde je eine GCB-Zelllinie (Riva) und je eine ABC-Zelllinie (SU-DHL4) mit den PIM-Inhibitor LGB32, dem mTOR-Inhibitor RAD001 und mit Rituximab einzeln und in Kombination für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Expression von p4E-BP1, Mcl-1 und c-Myc mittels Western Blot untersucht. Die Kontrolle der Ladung wurde durch β -Aktin sichergestellt.

Die Beobachtung, dass eine Einzelbehandlung mit SGI-1776 ebenso wie eine Einzelbehandlung mit LGB321 die Expression der Proteine nur moderat bzw. nicht beeinflusste, traf für die in Versuchsansätzen mit SGI-1776 untersuchten Zelllinien SU-DHL4, Hbl1 und Riva ebenfalls zu (Daten der Versuche mit SGI-1776 nicht gezeigt). Bei Riva (siehe Abbildung 15A) ergab sich nach der Einzelbehandlung mit LGB321 oder mit RAD001 eine geringfügige Abnahme der Phosphorylierung von 4E-BP1 und eine leichte Herunterregulation von c-Myc. Mcl-1 zeigte keine Veränderung in der Proteinexpression. Unter der Behandlung mit Rituximab kam es zu einer Hochregulation von p4E-BP1 und Mcl-1. LGB321 in Kombination mit RAD001 bewirkte eine verminderte Expression von p4E-BP1, Mcl-1 und c-Myc. Die ausgeprägteste Herunterregulation aller untersuchten Proteine wurde durch die Kombination der drei Substanzen induziert.

A Riva



-	+	-	-	+	+	-	+	LGB321 0,5 μM
-	-	+	-	+	-	+	+	RAD001 0,02 μM
-	-	-	+	-	+	+	+	Rituximab 10 μg/ml

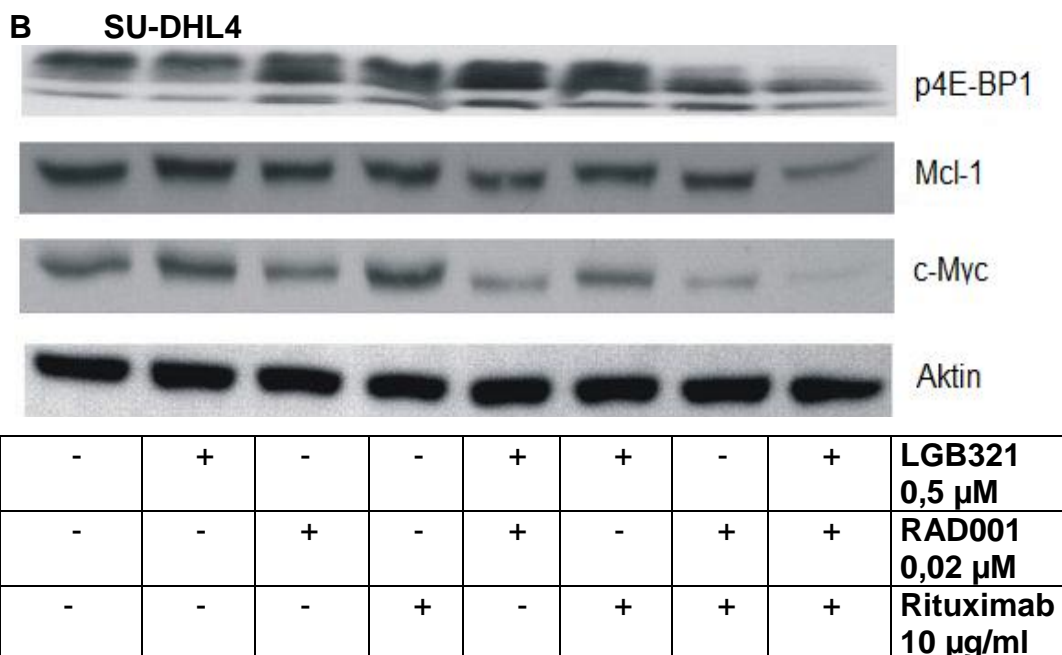


Abbildung 15: Die Behandlung mit der Kombination von LGB321, RAD001 und Rituximab führt zu einer verminderten Expression der Proteine p4E-BP1, Mcl-1 und cMyc bei DLBCL-Zelllinien.

(A) Riva und (B) SU-DHL4 wurden nach 24-stündiger Inkubation mit LGB321, RAD001 und Rituximab einzeln und in Kombination auf die Proteinexpression mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. β -Aktin diene als Beladungskontrolle.

Bei SU-DHL4 (siehe Abbildung 15B) zeigten die eingesetzten Substanzen alleine keine Auswirkungen auf die Expression von p4E-BP1, Mcl-1 und c-Myc. LGB321 in Kombination mit RAD001 ergab eine dezente Herunterregulation von Mcl-1 und c-Myc. Am deutlichsten sichtbar hingegen bewirkten die Substanzen in dreifacher Kombination eine stark verminderte Expression der untersuchten Proteine.

Eine durch die Substanzen gemeinsam induzierte verminderte Expression der Proteine p4E-BP1, Mcl-1 und c-Myc kann eine Erklärung für die in den Zellproliferationsassays gezeigten verstärkten Effekte auf die Viabilität sein (siehe Abbildung 9).

3.7. Auswirkungen der Substanzen auf die cap-abhängige mRNA-Translation

Der PIM-Signalweg, der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg als auch der MAP-ERK-Signalweg haben Auswirkungen auf die Phosphorylierung von 4E-BP1 [55,61,95,96] und damit auch auf die Freisetzung von eIF-4E. Somit ergeben sich über die Signalwege Auswirkungen auf den sich bildenden Translationsinitiationskomplex eIF-4F. Der Einfluss der Substanzen LGB321, RAD001 und Rituximab auf die cap-abhängige mRNA- Translation wurde mittels m^7 GTP pull-down Assay analysiert. Die Zelllinien Riva und SU-DHL4 wurden für 24 Stunden mit den Substanzen einzeln und in Kombination behandelt. Nach der Lyse und der Isolation der Proteine eIF-4E, eIF-4G1 und 4E-BP1

durch Affinitätschromatographie mit Hilfe von m⁷GTP-Sepharose, konnten die Proteine mittels Western Blot dargestellt werden. Dabei diente das Signal von eIF-4E als Beladungskontrolle und als Referenzwert für die Veränderungen der Signale von eIF-4G1 und 4E-BP1. Die für diese Analyse verwendeten Antikörper erkennen nur die unphosphorylierte Formen der untersuchten Proteine.

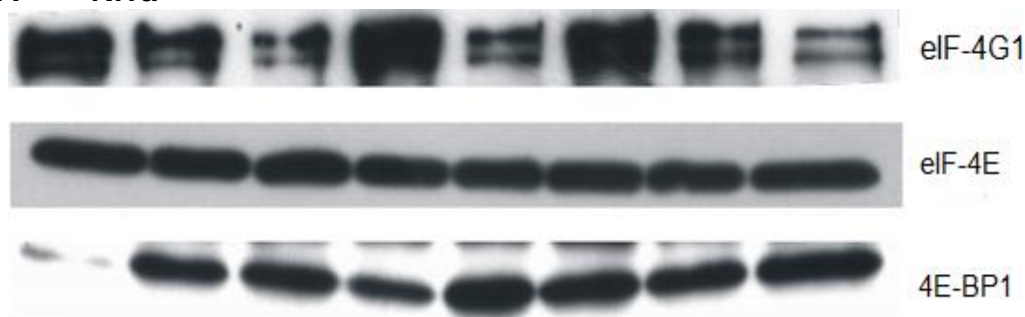
Die nachfolgenden Western Blot Analysen des Translationsinitiationskomplexes wurden nur zweimal durchgeführt, das heißt die Ergebnisse eines Versuchs wurden mit einem weiteren unabhängigen Versuch mit ähnlichen Ergebnissen bestätigt.

Bei unbehandelten DLBCL-Zellen mit aktivem PI3K/AKT/mTOR-, PIM- und MAP-ERK-Signalweg entsteht im Falle einer Bildung des Translationsinitiationskomplexes ein schwaches Signal von 4E-BP1. 4E-BP1 wird durch mTORC1 [55,95,96] oder auch über den PIM-Signalweg [61] und den MAP-ERK-Signalweg [55] phosphoryliert. Bei einer Hyperphosphorylierung von 4E-BP1 wird eIF-4E nicht länger gebunden und damit freigesetzt. Es wandert in den Zellkern und bindet dort an eIF-4G1, einer Komponente des Translationsinitiationskomplexes eIF-4F. Das Signal von eIF-4G1 sollte dann deutlich sichtbar sein.

Die Ergebnisse der Versuche zeigten bei der ABC-Zelllinie Riva (siehe Abbildung 16A) in unbehandelten Zellen ein schwaches Signal für 4E-BP1 und ein starkes Signal bei eIF-4G1, was auf eine starke Bildung des Translationsinitiationskomplexes schließen lässt. Durch die Behandlung mit LGB321 wurde das Signal bei 4E-BP1 stärker, das heißt der Anteil an unphosphoryliertem, mit eIF-4E gebundenem 4E-BP1 nahm zu. Das Signal bei eIF-4G1 wurde im Vergleich zu Kontrollprobe schwächer und deutet auf eine Abnahme der Komplexbildung hin. Noch deutlicher sichtbar wurden diese Ergebnisse bei dem Einsatz von RAD001. Durch eine Behandlung mit Rituximab kam es zu einer Verstärkung von eIF-4G1. Im Vergleich zur Mediumkontrolle zeigte sich zwar auch eine leichte Zunahme von 4E-BP1, diese war jedoch gegenüber den Ergebnissen von LGB321 und RAD001 geringer. Passend zu einer Zunahme von eIF-4G1 unter Rituximab und damit ungehemmter Komplexbildung und Aktivierung der cap-abhängigen mRNA-Translation in diesem Versuchsansatz zeigte sich in den Western Blot-Experimenten bei der Analyse der Schlüsselproteine unter Rituximab eine Hochregulation von p4E-BP1 und Mcl-1 und keine Abnahme der Proteinexpression (siehe Abbildung 15A). Rituximab alleine scheint also zu keiner Hemmung der cap-abhängigen mRNA-Translation zu führen. Der Einfluss von Rituximab zeigte sich auch bei der Kombination mit den beiden Inhibitoren und führte in der Zweifach-Kombination

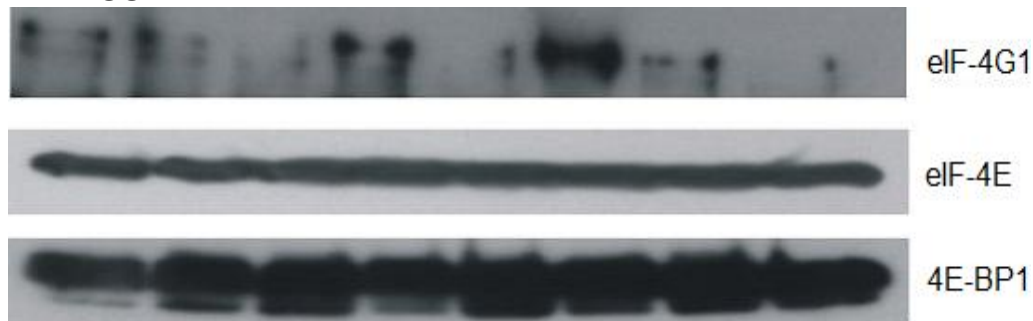
mit LGB321 zu einem reduzierteren Effekt als LGB32 alleine. In der Kombination von Rituximab mit RAD001 zeigten sich eine Reduktion von eIF-4G1 und ein Anstieg von 4E-BP1 im Vergleich zur Mediumkontrolle. Bestärkt wurden auch diese Ergebnisse mit den Erkenntnissen aus Abbildung 15A. Hier kam es in der Western Blot Analyse bei dem Einsatz von Rituximab und RAD001 zu einem Abfall von c-Myc und Mcl-1. Den stärksten Effekt in Bezug auf den Abfall von eIF-4G1 und den Anstieg von 4E-BP1 sah man für Riva bei der Zweifach-Kombination von LGB321 mit RAD001 bzw. bei der Kombination aller drei Substanzen. Verglichen mit der am stärksten verminderten Expression der Proteine Mcl-1 und c-Myc beim gemeinsamen Einsatz aller drei Substanzen in Abbildung 15A erscheint die Dreifach-Kombination aktiver hemmend auf die cap-abhängige mRNA-Translation zu wirken als eine Zweifach-Kombination mit LGB321 und Rituximab.

A Riva



-	+	-	-	+	+	-	+	LGB321 0,5 µM
-	-	+	-	+	-	+	+	RAD001 0,02 µM
-	-	-	+	-	+	+	+	Rituximab 10 µg/ml

B SU-DHL4



-	+	-	-	+	+	-	+	LGB321 0,5 µM
-	-	+	-	+	-	+	+	RAD001 0,02 µM
-	-	-	+	-	+	+	+	Rituximab

								10 µg/ml
--	--	--	--	--	--	--	--	-----------------

Abbildung 16: Die Kombination von LGB321 mit RAD001 und Rituximab führt zu einer verminderten Bildung des Translationsinitiationskomplexes.

(A) Riva und (B) SU-DHL4 wurden nach 24-stündiger Inkubation mit LGB321, RAD001 und Rituximab einzeln und in Kombination auf die Expression von eIF-4G1 und 4E-BP1 mittels m⁷GTP Pull-down Assay, SDS-PAGE und Western Blot untersucht. eIF-4E diente als Beladungskontrolle.

Die Ergebnisse der GCB-Zelllinie SU-DHL4 (siehe Abbildung 16B) ähnelten denen der ABC-Zelllinie Riva im Bezug auf die Expression von 4E-BP1. Das Signal für eIF-4G1, das in der Kontrollprobe der unbehandelten Zellen auf eine Aktivierung der cap-abhängigen mRNA-Translation hinwies, war bei SU-DHL4 geringer als bei der Kontrollprobe der Riva Zellen. Aber auch bei SU-DHL4 sah man, dass eine Behandlung mit den Inhibitoren LGB321 oder RAD001 zu einer Zunahme der Signalstärke von 4E-BP1 und zu einer Abnahme von eIF-4G1 führte, was auf eine Reduktion der Komplexbildung und somit verminderte cap-abhängige mRNA-Translation hinwies. Dies galt aber wiederum nicht für die eIF-EG1 Expression in Zellen, die mit Rituximab behandelt wurden. Obwohl die Ergebnisse bei SU-DHL4 nicht so deutlich sichtbar waren, schien sich auch bei SU-DHL4 durch eine Dreifach-Kombination der Substanzen die Menge an mit eIF-4E gebundenem 4E-BP1 nicht wesentlich von der bei einer Zweifach-Kombination von LGB321 mit RAD001 zu unterscheiden. Jedoch ist, wie bei Riva auch, anzumerken, dass bei einem Vergleich der Ergebnisse dieses Experiments mit den Ergebnissen der Western Blot Analyse der Schlüsselproteine (siehe Abbildung 15B) eine Dreifach-Kombination von Vorteil zu sein scheint. Die Abnahme von Mcl-1 und c-Myc, als zwei Proteine, die cap-abhängig translatiert werden, war deutlich ausgeprägter bei der Dreifach-Kombination der Substanzen und lässt sich durch die in diesem Experiment gezeigte Abnahme der Translationsinitiationskomplexbildung erklären.

4 Diskussion

In den letzten Jahrzehnten haben sich Dank der Genexpressionsanalyse wichtige Erkenntnisse über die Subgruppen bei DLBCL ergeben. Die unterschiedliche Aktivierung einiger Signalwege spielt hierbei eine große Rolle in der Differenzierung der beiden Subgruppen ABC und GCB [19,20,21]. Substanzen gegen Schlüsselproteine dieser Signalwege sind in der Forschung vielfach vertreten und haben sogar teilweise schon ihren Weg in die klinische Anwendung gefunden. Jedoch findet die Analyse auf ABC versus GCB mittels *gene expression profile* momentan nur in Studien statt und sollte außerhalb von Studien auch keinen Einfluss auf die Therapiewahl haben [133]. Die Unterscheidung zwischen GCB und non-GCB mittels Immunhistochemie [47] ist nicht allgemein anerkannt und sollte ebenfalls keinen Einfluss auf die Therapie haben [133].

Bei ABC-DLBCL ist die konstitutive Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF- κ B bekannt [20,31]. Diesen Transkriptionsfaktor kann man aber bisher nicht gezielt hemmen. Man glaubt zwar, dass möglicherweise Lenalidomid oder Bortezomib einen hemmenden Einfluss auf NF- κ B haben [43,46], in der auf der Konferenz der American Society of Hematology (ASH) 2015 gezeigten Studie REMODL-B brachte jedoch die Hinzunahme von Bortezomib zu R-CHOP weder bei der Gesamtgruppe der Patienten mit ABC-DLBCL noch bei GCB-DLBCL Patienten einen Benefit [44]. Eine 2017 auf der 14. International Conference on Malignant Lymphoma gezeigte Subgruppenanalyse der REMODL-B zeigte lediglich für Patienten mit einem ABC-DLBCL und niedrigem IPI einen Benefit für die Hinzunahme von Bortezomib zu R-CHOP [134]. Für Lenalidomid oder die Hemmung der upstream von NF- κ B gelegenen Tyrosinkinase BTK mit Ibrutinib wird zwar ein stärkerer Benefit für die ABC als für die GCB Lymphome aufgrund von Daten aus Phase II –Studien vermutet [46]. Phase III - Studien für alle DLBCL gibt es jedoch noch nicht.

Bei den GCB-DLBCL ist der PI3K-AKT-mTOR Signalweg häufiger aktiviert [27]. Eine Weiterentwicklung der Therapie ist gefragt, da trotz deutlicher Fortschritte im Verständnis der molekularen Grundlagen des DLBCL und in einer verbesserten Therapie die Erkrankung bei etwa 30-40% der Patienten weiterhin jedoch nicht geheilt werden kann [37]. Eine schlechte Prognose betrifft insbesondere Patienten, die an einem ABC-Subtyp leiden [20].

In vielen klinischen Studien werden gegenwärtig Therapien untersucht, welche gezielt die befallenen Zellen abtöten und gesunde Zellen verschonen. Die sogenannten *targeted therapies* haben idealerweise ein günstigeres Nebenwirkungsprofil als die klassische Chemotherapie und bieten gleichzeitig den behandelten Patienten einen Überlebensvorteil im Vergleich zur Standardchemotherapie. Dieser Hoffnung bezüglich der *targeted therapy* hat sich bei der Behandlung des DLBCL bisher jedoch nur unzureichend erfüllt. Lediglich der Antikörper Rituximab stellt einen bereits etablierten erfolgreichen Vertreter dieser Therapieform bei Patienten mit NHL dar [56].

Im Interesse der aktuellen Forschung bei DLBCL stehen unter anderem der PI3K/Akt/mTOR -, der JAK/Stat/PIM - sowie der MAPK - Signalweg über ERK1/2. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutsamkeit dieser Signalwege bei DLBCL untersucht. Die molekularen Strukturen wurden auf das Ansprechen auf eine Kombinationstherapie aus Rituximab, dem bereits intensiv untersuchtem und zum Teil in der klinischen Praxis schon angewandtem RAD001 und dem vielversprechenden LGB321 analysiert. Mutationen in den Signalwegen sind bei beiden Subgruppen des DLBCL nachgewiesen [27,28,91,61,67]. Die Signalwege sind über wichtige Schlüsselproteine miteinander verbunden und münden in einer gemeinsamen Endstrecke, der cap-abhängigen mRNA-Translation. Hieraus ergibt sich aber auch ein potentiell Problem beim Einsatz der *targeted therapy*. Durch die Hemmung eines Signalwegs könnte es als Ausgleich zur verstärkten Aktivierung eines anderen Signalwegs kommen. Bekannt ist dieses Phänomen unter anderem bei Patienten mit Lungenkarzinom und Mutation des epidermal growth factor receptor (EGFR), die mit einem Tyrosinkinaseinhibitor behandelt werden [135]. Ein möglicher Resistenzmechanismus auf den Tyrosinkinaseinhibitor ist beispielsweise die Hochregulation eines Signalwegs mit c-mesenchymal-epidermal Transition (c-MET) als Schlüsselprotein [135].

Trotz dieser Gegenargumente ist der Einsatz zielgerichteter Inhibitoren bzw. Antikörper sinnvoll und bei anderen Tumorentitäten bereits etabliert. Bereits zugelassen und in der klinischen Anwendung ist die Kombination zielgerichteter Therapien bei malignen Melanomen, die eine B-RAF proto-oncogene (BRAF)-Mutation aufweisen. Hier kommen ein BRAF- und ein MEK-Inhibitor zum Einsatz und erschweren somit die Resistenzbildung [136].

Aktuell haben sich PIM-Inhibitoren in der klinischen Anwendung noch nicht etabliert. PIM-Inhibitoren wurden bei einer Vielzahl von hämatologischen Neoplasien untersucht.

Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen belegen die Wirksamkeit des Inhibitors SGI-1776 in Zelllinienmodellen. So wurde SGI-1776 zum Beispiel bei CLL oder AML untersucht [81,84]. Über die Wirkung von LGB321 auf hämatologischen Erkrankungen gab es zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Dissertation lediglich eine Veröffentlichung [82]. Zum Einsatz von PIM-Inhibitoren in klinischen Studien ist es bereits gekommen. 2008 und 2010 wurde der PIM-Inhibitor SGI-1776 in Phase I - Studien bei Patienten mit NHL, Leukämie und Prostatakarzinom angewandt. Die Studien wurden jedoch vorzeitig aufgrund der starken Nebenwirkungen abgebrochen [85,86]. Mit PIM447, davor auch LGH447 genannt, konnte ein pan-PIM-Inhibitor entwickelt werden, der nun erfolgreich in Phase I - Studien bei Patienten mit rezidivierendem MM eingesetzt wurde [87]. In der Studie, die sowohl zur Dosisfindung als auch zur Verträglichkeitsfindung und zur Bestimmung der Antimyelomaktivität diente, zeigte sich bei 68,8% der untersuchten 48 Patienten ein Ansprechen auf die Behandlung mit LGH447 [87].

Ziel dieser Dissertation war es zu untersuchen, inwiefern die Hemmung verschiedener, miteinander interagierender Signalwege einen Effekt auf Proliferation, Zelltod, Autophagie und Schlüsselproteine bei verschiedenen DLBCL-Zelllinien hat. Eine zentrale Komponente aller untersuchten Signalwege ist hierbei ihre Beteiligung an der Regulation der cap-abhängigen mRNA-Translation [54,61,98,100] und hierüber auch die Steuerung von Proteinen für Zellproliferation, Zellzyklusregulation als auch für Apoptose. Die Hypothese der vorliegenden Arbeit ist daher, dass durch die Kombination mehrerer Substanzen in der entarteten Lymphomzelle verschiedene Signalwegen, die miteinander interagieren bzw. als gemeinsamen Endstrecke die cap-abhängige mRNA-Translation haben, effektiver gehemmt werden können als durch den Einsatz einer Einzelsubstanz und sich daher verstärkende Effekte nachweisen lassen. Die verstärkenden Effekte durch eine Dreifachkombination könnten sowohl die Proliferation, den Zellzyklus, Autophagie und Apoptose betreffen als auch die gemeinsamen Schlüsselproteine der Signalwege und die gemeinsame translationale Endstrecke. Somit könnten sich verstärkende inhibitorische Effekte auf die Bildung des Translationsinitiationskomplexes und auf cap-abhängig translatierte Proteine ergeben.

4.1 Wirksamkeit der untersuchten Substanzen auf die Proliferation

4.1.1 PIM-Inhibitoren SGI-1773, SGI1776 und LGB321

Für die drei untersuchten PIM-Inhibitoren SGI-1773, SGI-1776 und LGB321 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sie die Proliferation bei DLBCL-Zelllinien und bei

primären Zellen hemmen (siehe Abbildung 6). Allerdings fielen bei der Analyse der Ergebnisse der verwendeten PIM-Inhibitoren deutliche Unterschiede in ihrer Wirksamkeit auf. LGB321 wirkte in niedrigeren Konzentrationen proliferationshemmend auf die untersuchten Zelllinien als SGI-1776 und SGI-1773.

Gründe für das unterschiedliche Ansprechen der hier untersuchten Zelllinien auf die Inhibitoren könnten durch die Spezifität der Inhibitoren auf die drei PIM-Kinasen bedingt sein. Während SGI-1776 vor allem PIM-1 und PIM-3 hemmt [81,84], zeichnet sich LGB321 als pan-PIM-Kinase-Inhibitor aus [82]. Die Arbeitsgruppe um L. Brault zeigte, dass in 101 von ihnen untersuchten Gewebeproben von Patienten mit DLBCL in 93 % der Proben PIM-1 exprimiert wird, 80 % sind positiv für PIM-2 und in nur 57 % der untersuchten Proben wird PIM-3 exprimiert [137]. In den von mir für diese Arbeit analysierten DLBCL-Zelllinien ließ sich die Expression der drei PIM-Kinasen in allen Zelllinien nachweisen (siehe Abbildung 14). Der Umstand, dass in DLBCL verstärkt PIM-1 und PIM-2 exprimiert wird, könnte erklären, dass LGB321 bei den untersuchten DLBCL-Zelllinien wirksamer ist als SGI-1776 und SGI-1773. Es muss aber angemerkt werden, dass die bessere Wirksamkeit von LGB321 auch an Unterschieden bezüglich der Affinität der Inhibitoren für die verschiedenen Zielstrukturen liegen könnte.

Publizierte Untersuchungen hierfür gibt es derzeit nicht.

Jedoch waren auch bei den Zelllinien in der hier vorgestellten Arbeit Unterschiede beim Ansprechen auf LGB321 sichtbar (siehe Abbildung 6C). So reagierten einige Zelllinien bereits bei geringeren Konzentrationen mit der Abnahme der Viabilität, andere wiederum reagierten erst auf höhere Konzentrationen und die GCB-Zelllinien DB und Oci Ly2 erwiesen sich als partiell resistent. Die Arbeit von T.L. Peters, die den pan-PIM-Inhibitor PIM447 unter anderem an DLBCL Zelllinien untersuchte, ergab diesbezüglich ähnliche Ergebnisse [138]. Die Arbeitsgruppe stellte fest, dass es sowohl zwischen den Zelllinien hämatologischer Neoplasien, wie dem großzelligen anaplastischen Lymphom, dem Burkitt-Lymphom, ALL, MCL, CLL und DLBCL, als auch zwischen Zelllinien der Untergruppen des DLBCL, ABC, GCB und nicht näher definierte DLBCL, große Abweichungen bezüglich des Ansprechens auf PIM447 gab [138]. Bei den von der Arbeitsgruppe detektierten, auf PIM447 sensibel reagierenden, ABC Zelllinien lag bei vier von den sieben untersuchten Zelllinien der IC_{50} -Wert $< 3 \mu M$ [138]. Diese Erkenntnisse decken sich mit meinen Ergebnissen der Proliferationsanalysen (siehe Tabelle 10). Die Daten der Arbeitsgruppe als auch meine Ergebnisse wurden nach 72 Stunden Inkubationszeit mit dem Inhibitor erhoben.

Als Erklärung für das unterschiedliche Ansprechen bei den von mir untersuchten Zelllinien kann nicht alleine die Expression der PIM-Kinasen dienen. Meine Analyse zeigte, dass keine Korrelation zwischen einer starken Expression der PIM-Kinasen (siehe Abbildung 14) und einem guten Ansprechen auf die Inhibitoren bestand (siehe Tabelle 10). Gestützt wird dieses Erkenntnis auch von Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [137].

Die Einteilung in die Subgruppen ABC und GCB bietet eine alternative Erklärung auf das unterschiedliche Ansprechen der Zelllinien auf PIM-Inhibitoren. Einige der hier untersuchten ABC-Zelllinien schienen, wie andere Arbeitsgruppen ebenso nachweisen konnten [138], sensitiv auf PIM-Inhibitoren zu reagieren. ABC-Zelllinien weisen eine stärkere Expression der PIM-Kinasen 1 und 2 als Zelllinien der Subgruppe GCB auf. Publierte Daten [19,137] und auch eigene Ergebnisse dieser Arbeit (siehe Abbildung 14) belegen das. Jedoch gibt es Hinweise, dass mit einer starken Expression von PIM-1 und PIM-2 auch komplexe Mechanismen, die die Inhibitoren in ihrer Wirkung antagonisieren, einhergehen [137].

Ein weiterer Grund für das sensitive Ansprechen von ABC-Zelllinien auf PIM-Inhibitoren könnte in der konstitutiven Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs liegen. Bei dem ABC-Subtyp handelt es sich um B-Zellen, die sich in der Differenzierung zu Plasmazellen befinden [19] und als wichtigstes Charakteristikum einen konstitutiv aktivierten NF- κ B-Signalweg aufweisen [20]. Somit gibt es zwischen Zellen des ABC-Subtyps und Zellen des MM gewisse Parallelen. Beim MM handelt es sich eine klonale Tumorerkrankung von Plasmazellen [139], die ebenso, wie bei Zellen des ABC-Subtyps, unter anderem eine Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs aufweisen [140]. Patienten mit einem Rezidiv eines MM wurden mittlerweile erfolgreich in einer Phase I - Studie mit einem pan-PIM-Inhibitor behandelt [87]. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wirkt unter anderem auf die Expression von PIM-2 [72], somit ist das Ansprechen auf PIM-Inhibitoren bei Zellen, die einen aktivierten NF- κ B-Signalweg aufweisen, möglicherweise hierdurch zu erklären. Wie andere Arbeitsgruppen [138] ebenso beschreiben, gibt es unter den von mir untersuchten ABC-Zelllinien sowohl sehr sensible ABC-Zelllinien, als auch Zelllinien, die nicht auf einen PIM-Inhibitor reagieren. Als mögliches Einteilungskriterium für dieses Verhalten konnte T.L. Peters die Höhe der vorliegenden Mutation im NF- κ B-Signalweg ausmachen [138]. Die Arbeitsgruppe konnte in ihrer Arbeit mit dem pan-PIM-Inhibitor PIM447 nachweisen, dass bei den von ihnen untersuchten ABC Zelllinien, die auf den Inhibitor sensitiv reagieren, eine downstream liegende Aktivierung des NF- κ B-

Signalwegs vorliegt [138]. Zelllinien mit upstream liegenden, aktivierenden Signalen, wie zum Beispiel Mutationen in CD79A, CD79B oder MYD88, sprechen in der Arbeit von T.L. Peters nicht auf den untersuchten PIM-Inhibitor an [138]. Für die sowohl in meiner Arbeit auf die PIM-Inhibitoren SGI-1776 und SGI-1773 als auch bei Peters et al. unempfindlich reagierende Zelllinie TMD8 ist eine CD79B- als auch MYD88-Mutation, sowie eine zusätzliche PIM-1-Mutation, beschrieben [138].

Oci Ly3 und Oci Ly 10 hingegen zeigten in meiner Arbeit kein Ansprechen auf SGI-1776 und SGI-1773, weisen jedoch beide downstream Mutationen in CARD11 und A20, als auch upstream Mutationen in CD79B und MYD88, auf und reagieren bei Peters et al. sehr sensibel auf PIM447 [138]. Meine mögliche Hypothese, die diesen Unterschied zwischen meinen Ergebnissen und den Ergebnissen in der Arbeit von T.L. Peters erklären könnte, sind die Kulturbedingungen für die Zelllinien Oci Ly3 und Oci Ly10. Ebenso wie die Zelllinie Oci Ly2 benötigen sie, anders als die anderen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, das Zellkulturmedium IMDM. Hierbei handelt es sich um ein serumfreies Medium mit Vitaminen, Aminosäuren und Selen, welches durch die 20%ige Zugabe von humanem Plasma und Antibiotika P/S unter anderem zur Kultur von Lymphozyten verwendet werden kann. Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in RPMI-1640 Zellkulturmedium mit dem 10%igem Zusatz von FBS und Antibiotika kultiviert. Für die PIM-Inhibitoren SGI-1773 und SGI-1776 ist beschrieben, dass sie zu mehr als 95 % an Proteine im humanen Plasma und in geringerem Ausmaß an FBS binden [81]. Möglich ist, dass durch den Einsatz des Kulturmediums IMDM bei Oci Ly3 und Oci Ly10 mit dem Zusatz von humanem Plasma die Wirkung der Inhibitoren SGI-1776 und SGI-1773 geschwächt bzw. aufgelöst wurde. Da die Zelllinien Oci Ly3 und Oci Ly10 in den Versuchen mit SGI-1776 und SGI-1773 resistent wirkten, erfolgten keine Versuche mit LGB321. Die in meinen Versuchen bei diesen Zelllinien trotz downstream Mutationen in CARD11 und A20 aufgetretene Resistenz auf die PIM-Inhibitoren könnte somit in beiden Zelllinien als Zellkultur bedingtes Problem angesehen werden.

Die Zelllinie Riva reagierte sowohl in meinen Untersuchungen als auch bei Peters et al. sensibel auf PIM-Inhibitoren. Bei Riva liegt eine downstream Mutation in Form einer A20-Mutation vor [138], jedoch lässt sich auch eine upstream Mutation in MYD88 nachweisen [141]. Somit scheinen die Einteilungskriterien für das unterschiedlich sensible Ansprechen der ABC-Zelllinien auf PIM-Inhibitoren noch nicht vollständig erkannt und erforscht zu sein.

Allein die Tatsache, dass die mit einer schlechteren Prognose assoziierte Subgruppe ABC sensitiv auf PIM-Inhibitoren reagieren, machen PIM-Inhibitoren bei DLBCL zu einer untersuchenswerten Substanzgruppe.

Bei den GCB-Zelllinien ist die Wirksamkeit der PIM-Inhibitoren jedoch breit gestreut. Unter den GCB-Zellen reagierten SU-DHL4 und SU-DHL6 in meiner Arbeit sensibel auf LGB321. Gründe für das breit gefächerte Ansprechen innerhalb der GCB-Zelllinien auf LGB321 lassen sich nur vermuten. Eine Möglichkeit könnte in Veränderungen bei der Bindung des Inhibitors liegen. LGB321 als kompetitiver Inhibitor konkurriert mit ATP um die ATP-Bindungsstelle der PIM-Kinasen. Ist in der Zelle viel ATP vorhanden, lässt sich der Inhibitor von der Bindungsstelle verdrängen und die Wirkung von LGB321 wird abgeschwächt. Erst wenn die Konzentration des Inhibitors, die des ATP in der Zelle übersteigt, ist eine Bindung möglich. Für partiell resistente Zellen, die erst bei hohen Konzentrationen auf LGB321 reagieren, könnte dies zutreffen.

4.1.2 CD-20 Antikörper Rituximab

Bei der Proliferationshemmung durch Rituximab ließen sich in dieser Arbeit nur sehr moderate Effekte erzielen (siehe Abbildung 7). Im Gegensatz zu den gezeigten Ergebnissen dieser Arbeit steht der etablierte Einsatz von Rituximab in der Behandlung von Patienten mit hämatologischen Neoplasien [56]. Die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien zeigten eine Abnahme der Proliferation von höchstens 40%. Die Gründe für das mangelnde Ansprechen kann in der *in vitro* Situation der Arbeit liegen. Hier fehlen die durch ADCC und Komplement vermittelten Effekte von Rituximab. Außerdem konnte in Zelllinienmodellen nachgewiesen werden, dass CD-20-Antikörper mit dem zusätzlichen Einsatz von *cross-linking* durch Antikörper vernetzende F(ab')₂-Fragmente, welches die *in vivo* stattfindenden Vorgängen mit der Bildung von großen Rituximab-CD-20-Komplexen nachahmen, im Vergleich zu löslichem CD-20-Antikörper zu einer Effektverstärkung führen [142]. In den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen kann es somit nur über die direkten Wirkmechanismen von Rituximab zu einer Wachstumshemmung kommen. Für direkt vermittelte Rituximab-Stimuli konnte eine Hemmung von ERK-vermittelten Signalen gezeigt werden [54]. Rituximab hemmt die Signalübertragung des BCR und führt zu einer Apoptoseinduktion [142].

ABC-Zelllinien können durch Mutationen eine chronische Aktivierung der BCR-Signalwege aufweisen [27,35,24,22]. Diese Mutationen machen die Zellen unabhängig

von BCR-vermittelten Signalen. Für GCB ist keine dominante Rolle des BCR-Signalwegs beschrieben.

Am sensibelsten reagierten die ABC-Zelllinien Hbl1 und Riva und die GCB-Zelllinie SU-DHL4 auf die Behandlung mit Rituximab. Für Hbl1 ist ein Wildtyp CARD11 beschrieben [24], jedoch weist die Zelllinie eine MYD88- [35] und eine CD79B – Mutation auf. Bei Riva liegen keine Mutation bei CARD11 und ein CD79-Wildtyp vor [141]. Wie die meisten der in dieser Arbeit untersuchten ABC-Zelllinien lässt sich auch bei Riva eine MYD88-Mutation nachweisen [141]. Interessanterweise müsste sich nun daraus eigentlich schließen lassen, dass diese Zelllinien unabhängig von BCR-vermittelten Signalen sind und nicht allzu sensibel auf Rituximab reagieren würden. Jedoch ist noch immer nicht komplett verstanden, wie Rituximab seine Wirkung vermittelt [40]. In Zelllinienmodellen konnte nachgewiesen werden, dass Rituximab bei B-NHL als starker Apoptoseinduktor wirkt und zu der Aktivierung von Caspase 3 führt und das als Erklärung für eine Proliferationsabnahme dienen kann [142].

Die GCB-Zelllinie SU-DHL4 zeigte die stärkste Proliferationsabnahme auf Rituximab und in weiteren Versuchen in meiner Arbeit beim Einsatz von Rituximab eine deutliche Apoptoseinduktion mit einer Zunahme an toten Zellen in der Zellzyklusanalyse (siehe Tabelle 11B) sowie dem Nachweis von Caspasen - und PARP – Spaltung (siehe Abbildung 12B und Abbildung 13B). Es ist in der Literatur beschrieben, dass SU-DHL4 eine ungewöhnlich hohe CD 20-Expression aufweist [143]. Naheliegend ist die Erklärung, dass Zelllinien mit einem hohen CD 20-Level sensibler auf eine Therapie mit Rituximab reagieren sollten. Dies könnte als Erklärungsmodell dienen, warum sich die Auswirkungen von Rituximab bei SU-DHL4 deutlich darstellen und bei der Zelllinie Riva dies nicht der Fall ist. Jedoch werden diese Überlegungen von Arbeiten widerlegt, die das Expressionsmuster von CD20 bei refraktärer CLL oder bei Patienten mit einem Rezidiv der CLL untersuchen und mit dem Ansprechen auf eine Rituximabtherapie vergleichen [144].

Eine weitere Theorie, die das unterschiedliche Ansprechen der Zelllinien auf Rituximab erklären könnte, sind Mutationen am für das CD20 Oberflächenmolekül codierenden Gen. Somit würde sich das Bindungsverhalten des Antigens mit dem Antikörper verändern.

4.1.3 Kombinationswirkung

Eine Kombination verschiedener Substanzen, um die Signalwege gezielt auszuschalten bzw. den Effekt auf ihre gemeinsame Endstrecke verstärken zu können, könnte sinnvoll sein. Auch andere Arbeitsgruppen untersuchen zum Beispiel die Kombination von RAD001 mit Rituximab bei DLBCL [145,146]. Die Arbeitsgruppe um Z. Xu wies bei der Kombinationsbehandlung von DLBCL Zelllinien mit Everolimus und Rituximab eine effektivere Inhibition des Zellwachstums, eine Zunahme des G₁-Phasenarrestes und Zunahme an apoptotischen Zellen nach [145]. Auch beim Einsatz der Kombinationsbehandlung an einem Xenograftmodell zeigte sich eine Wachstumshemmung [145]. In einer in den Jahren 2009 und 2010 durchgeführter Phase II - Studie mit 24 Patienten mit einem Rezidiv eines DLBCL zeigte sich, dass 38% der Patienten auf die Kombinationstherapie von Everolimus und Rituximab ansprachen. Drei Patienten wiesen ein komplettes Ansprechen auf und sechs Patienten zeigten ein partielles Ansprechen [146]. Nach 12 Monaten ergab sich eine Gesamtüberlebensrate von 37% [146]. Die meisten Nebenwirkungen bei der Kombinationstherapie betrafen das blutbildende System mit Neutropenie, Anämie und Thrombozytopenie [146].

Publizierte Untersuchungen mit Kombinationen mit PIM-Inhibitoren und mTOR-Inhibitoren oder Rituximab gibt es momentan bei DLBCL noch nicht. Die Arbeitsgruppe um H.P. Kuo konnte bei ABC-DLBCL-Zelllinien nachweisen, dass es bei der Kombination eines pan-PIM-Inhibitors mit Ibrutinib, einem BTK-Inhibitor, zu einem synergistischen Effekt auf die Zellproliferation *in vitro* und Hemmung von Tumorwachstum *in vivo* kommt [147]. Arbeiten bei anderen hämatologischen Neoplasien wie AML oder auch CLL zeigen Kombinationseffekte von AZD1208, einem pan-PIM-Inhibitor, mit AZD2014, einem dualen mTORC1/2-Inhibitor [148], oder auch mit BCL-2 Antagonisten [149]. Die Arbeitsgruppe um M. Harada wies nach, dass die Kombination des PIM-Inhibitors AZD2014 mit einem dualen mTOR-Inhibitor bei AML Zelllinien zu einem hemmenden Effekt auf das Wachstum der Zellen führte [148]. Vermittelt wurde der Effekt über die Herunterregulation der Proteinsynthese und durch die Induktion der Apoptose [148]. Es zeigte sich beim gemeinsamen Einsatz der Inhibitoren erniedrigte Level an phosphoryliertem 4E-BP1 und phosphoryliertem S6K sowie bei einigen Zelllinien auch eine Herunterregulation von c-Myc [148]. Desweiteren konnte festgestellt werden, dass es durch den gemeinsamen Einsatz der beiden Inhibitoren zu einer Unterdrückung der Polysomenbildung kommt, die für den

reibungslosen Ablauf bei der cap-abhängigen mRNA-Translation eine große Rolle spielt [148].

In meiner Arbeit konnte ich bei den untersuchten ABC-Zelllinien Riva und Hbl1 die effektive proliferationshemmende Wirkung der Dreifachkombination gut nachweisen (siehe Abbildung 9). Etwas abgeschwächt zeigte sich dies auch bei der GCB-Zelllinie SU-DHL4 (siehe Abbildung 9).

Die verstärkte Proliferationshemmung durch die Kombination scheint nicht bedingt durch eine durch die Substanzen verursachte toxische Wirkung auf die Zellen zu sein. Dies bestätigte sich durch den Einsatz niedrigerer Konzentrationen und weiterhin sichtbarer Kombinationseffekte sowie anhand der durch die drei Substanzen induzierten Expressionsveränderungen der Schlüsselproteine (siehe Abbildung 15).

4.2 Veränderungen im Stoffwechsel als Erklärung für die Proliferationshemmung

Meine Proliferationsanalysen ergaben bei der Kombinationsbehandlung eine stärkere Reduktion des Signals in den MTT-Untersuchungen. Das bedeutet jedoch lediglich, dass sich die Zellen nicht mehr teilen. Über die Ursache der verminderten Proliferation ergibt sich hierbei keine Aussage und sollte durch Untersuchungen des Zellzyklus, der Apoptose und der Autophagie genauer erforscht werden.

4.2.1 Erklären Zellzyklusveränderungen und Apoptoseinduktion die beobachtete Proliferationshemmung?

Teilweise sind die Auswirkungen auf den Zellzyklus durch die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen schon bekannt.

So ist beschrieben, dass RAD001 über die Hemmung von mTOR zu einer Hemmung von Cyclin D1 und somit zu einem G₁-Phasenarrest führt [116]. Diese Erkenntnisse werden auch in den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt (siehe Tabelle 11).

Bei den untersuchten Zelllinien Riva und SU-DHL4 kam es durch den Einsatz von RAD001 zu einer Induktion eines Zellzyklusarrestes in der G₁-Phase. Deutlicher sichtbar war dies bei der GCB-Zelllinie SU-DHL4. Auch das deckt sich mit experimentellen Arbeiten und klinischen Studien, die zeigen, dass der GCB-Subtyp sensitiver auf RAD001 reagiert [132, 150].

Desweiteren ist bekannt, dass Rituximab Auswirkungen auf den Zellzyklus hat und Apoptose fördert [55, 142]. In meiner Arbeit zeigte sich bei der Zellzyklusanalyse eine steigende Anzahl an toten Zellen durch Rituximab. Auch hier reagierte die GCB-Zelllinie

SU-DHL4 sensibler. Die Induktion der Apoptose durch Rituximab bei SU-DHL4 ließ sich mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.5 erneut nachweisen. Hier zeigte sich beim Einsatz von Rituximab eine vermehrte Caspasen – und PARP-Spaltung. Durch die Kombination der Substanzen ließ sich die Caspasenspaltung sogar noch steigern. Diese Rituximab-vermittelten Effekte wurden in Zelllinienmodellen bereits beschrieben [142]. Die Arbeitsgruppe um S. Mathas konnte nachweisen, dass durch eine Behandlung mit 20µg/ml Rituximab, in dieser Arbeit aus dem Jahr 2000 noch IDEC-C2B8 genannt, bei SU-DHL4 nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden 35% apoptotische Zellen vorlagen [142]. Auch konnte in dieser Arbeit bei SU-DHL4 Rituximab-induziert eine Caspase 3 - sowie PARP -Spaltung nachgewiesen werden [142]. Allerdings wurde in dieser Arbeit Rituximab durch eine Oberflächenbeschichtung mit 20 µg/ml PBS unbeweglich gemacht, um so eine verbesserte Vernetzung von Rituximab und CD20 zu erreichen und erst danach erfolgte eine Inkubation der Zellen in den vorbehandelten Zellkultur-Platten. S. Mathes wies nach, dass zwischen Rituximab-vermittelte Apoptoseinduktion und BCR-vermittelte Apoptoseinduktion Zusammenhänge bestehen [142]. Die durch Rituximab induzierte Apoptose könnte durch einen direkten Effekt von Rituximab auf den hinter CD20 stehenden Signalweg erfolgen [142]. Es konnte als Hinweis auf eine Aktivierung des MAP-ERK-Signalwegs eine vermehrte Phosphorylierung von ERK1/2 nachgewiesen werden [142]. Ebenso wie bei BCR-vermittelter Apoptoseinduktion ergaben sich im von der Arbeitsgruppe untersuchten Zelllinienmodell beim Einsatz von Rituximab unter anderem eine Hochregulation des proapoptotischen Bax, eine Aktivierung von Caspase 3 und eine proteolytische Spaltung von PARP [142]. Diese Proteine stellen die Endphase der Apoptose dar. In der Endphase entsteht durch limitierte Proteolyse von unter anderem der Effektorcaspase 3 eine Spaltung von regulatorischen und strukturellen Proteinen der Zelle wie zum Beispiel PARP [151]. Dieses Todessubstrat leitet den apoptotischen Zelltod ein und führt zur Fragmentierung der DNA [151].

In meinen Ergebnissen zeigte sich bei der Dreifach-Behandlung bei SU-DHL4 eine starke Zunahme von Zellen, die sich im Zellzyklusarrest in der G₁-Phase befinden. Gleichzeitig stieg beim Einsatz von Rituximab die Anzahl der toten Zellen. Diese Ergebnisse könnten gemeinsam die Abnahme der Zellproliferation bei der Dreifach-Kombination erklären.

Für den ABC-Subtyp ist ein schlechteres Ansprechen auf die Therapie und eine schlechtere Prognose bekannt [20]. In dieser Arbeit zeigte sich, dass die von mir

untersuchte ABC-Zelllinie Riva sowohl in der Zellzyklusanalyse als auch in den Untersuchungen zur Induktion der Apoptose weniger sensibel reagierte und schlechter auf die verwendeten Substanzen ansprach. Jedoch sollte nicht von dem Verhalten einer Zelllinie auf die Substanzen auf den DLBCL-Subtyp geschlossen werden, da hierfür die Zelllinien zu heterogen sind.

4.2.2 Erklärt Autophagie die beobachtete Proliferationshemmung?

In beiden untersuchten Zelllinien Riva und SU-DHL4 zeigte sich schon in den unbehandelten Zellen, dass gespaltenes Lc3b vorlag und die Autophagiemechanismen hochreguliert waren (siehe Abbildung 11). Ein Grund für die Hochregulation der Autophagie könnte in den genetischen Besonderheiten der Zelllinien liegen. Riva und SU-DHL4 sind BCL-2 positive Zelllinien [152]. Es konnte gezeigt werden, dass BCL-2 positive Zellen ein höheres Grundlevel in der Aktivität der Autophagiemechanismen, aufgrund unterdrückter Apoptose, aufweisen [152]. Das antiapoptotische Protein BCL-2 fördert die Hochregulation der Autophagiemechanismen über die Inhibition der Bax/Bak vermittelten Apoptose [153].

Die eingesetzten Substanzen scheinen weder als Monosubstanz noch in Kombination Auswirkungen auf die Autophagie zu haben. Zwar ist für RAD001 eine Stimulation der Autophagie über die vermittelte Inhibition von mTORC1 erklärbar, mTORC1 wiederum hemmt im aktiven Zustand die für die Bildung der Autophagosomen wichtigen autophagy related proteins (ATG) [154], dieser Effekt ließ sich jedoch in meiner Arbeit nicht nachweisen. Es scheint sowohl bei SU-DHL4 als auch bei Riva Autophagie keiner der Mechanismen zu sein, weshalb die Zellen die von mir beobachtete Proliferationsabnahme durch die eingesetzten Substanzen zeigen.

4.3 Veränderungen in den Signalwegen als Erklärung für die Proliferationshemmung

In der Arbeit wurden Expressions- und Phosphorylierungsmuster wichtiger Schlüssel-moleküle der Signalwege um PI3K/AKT/mTOR, PIM und MAP-ERK untersucht (siehe Abbildung 14).

Analysen von gesunden humanen B-Zellen ergaben, dass der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg in diesen Zellen nicht dauerhaft aktiviert ist [155]. In den von mir untersuchten Zelllinien sah man eine Phosphorylierung von 4E-BP1 und eIF-4E, was als Hinweis für eine Dysregulation des Signalwegs bei DLBCL dienen kann.

Eine Überexpression der PIM-Kinasen ist für viele maligne Tumore beschrieben [61]. Eigene Ergebnisse und die Literatur belegen, dass PIM-1 und PIM-2 bei ABC-Zelllinien stärker exprimiert sind als bei GCB-Zelllinien [19,137].

Die MAPK ERK1/2, auch p44/42 genannt, welche in phosphoryliertem Zustand in ihrer aktiven Form vorliegt, ist bei den ABC-Zelllinien deutlich ausgeprägter. Bekannt ist, dass es unter anderem BCR-vermittelt zur Aktivierung des ERK-Signalwegs kommt [156,142]. Für Hbl1, welche in meinen Untersuchungen die stärkste Aktivierung von ERK1/2 aufwies, ist eine CD79B-Mutation bekannt, die zu einer chronischen BCR-Aktivierung führt [138]. Bei den GCB-Zelllinien zeigte vor allem SU-DHL4 eine starke Expression der aktivierten Form an.

4.3.1 Erklären Auswirkungen auf Schlüsselproteine die beobachtete Proliferationshemmung?

Über die Inhibition der Proteine p-4E-BP1, Mcl-1 und c-Myc ergeben sich Auswirkungen auf Zellproliferation und Zellüberleben. Eine Reduktion der Phosphorylierung von 4E-BP1 durch den Einsatz der Substanzen hat Folgen für die cap-abhängig translatierten Proteine Mcl-1 und c-Myc.

Der Einfluss von RAD001 auf den Phosphorylierungsstatus von p4E-BP1 ist bei vielen Malignomen in der Literatur bereits beschrieben [103,114]. So ist bekannt, dass eine Blockade von mTORC1 durch RAD001 initial in den ersten drei Stunden nach der Behandlung der Zellen mit RAD001 zu einer Hemmung der Phosphorylierung führt [157]. Im weiteren Verlauf erholen sich die Zellen jedoch wieder und es zeigt sich keine aussagekräftige Dephosphorylierung von 4E-BP1 [157]. Somit ergeben sich durch RAD001 als Monosubstanz auch keine Auswirkungen auf die durch cap-abhängige mRNA-Translation regulierten Proteine Mcl-1 und c-Myc. Auch in meinen Western Blot Analysen bestätigten sich diese Erkenntnisse (siehe Abbildung 15). Die Gründe hierfür können einerseits darin liegen, dass RAD001 mTORC1 nicht vollständig hemmen kann oder auch, dass der negative Feedback Loop, welcher durch die Inhibierung von p70S6K durch RAD001 ausgelöst wird, zu einer kompensatorischen Aktivierung des PI3K-Signalwegs führt. P70S6K, ein weiteres von mTORC1 phosphoryliertes Protein, führt bei einer Blockade seiner Phosphorylierung zu einem Anstieg der Phosphorylierung und Aktivierung von Akt und somit zur Aktivierung des PI3K-Signalwegs [98].

Für den PIM-Inhibitor SGI-1776 wurde bereits beschrieben, dass er bei CLL-, AML-, und MCL-Zelllinien zu einer verminderten Expression von Mcl-1, c-Myc und p4E-BP1 führt [68,81,84]. Bei den hier untersuchten DLBCL Zelllinien ließ sich der Effekt auf Mcl-1 und c-Myc sowohl mit SGI-1776 (Western Blot Analysen nicht gezeigt) als auch mit LGB321 bei der GCB Zelllinie SU-DHL4 nicht nachweisen. Bei der ABC Zelllinie Riva zeigte sich jedoch beim Einsatz von SGI-1776 (Western Blot Analysen nicht gezeigt) und bei LGB321 eine moderate Herunterregulation aller untersuchten Proteine (siehe Abbildung 15). Ein möglicher Grund für die Herunterregulation von Mcl-1 als auch von c-Myc durch LGB321 bei der ABC-Zelllinie könnte darin liegen, dass bei ABC DLBCL NF- κ B- und PIM-Kinase-Signalwege stark aktiviert sind [19,20,31,137]. Somit scheint hier zusätzlich zum PI3K-Signalweg über diese Signalwege eine Kontrolle der Mcl-1- und c-Myc-Expression vorzuliegen.

Rituximab zeigte keine Auswirkungen auf die Expression der Proteine.

In der Kombination der drei Substanzen erkannte man in meinen Analysen deutlich, dass eine Kombination den Effekt der einzelnen Substanz steigerte und es zu einer verstärkten Abnahme der Phosphorylierung von 4E-BP1 und einer verminderten Expression der Proteine Mcl-1 und c-Myc kam (siehe Abbildung 15). Andere Arbeitsgruppen konnten diesen Effekt bei hämatologischen Neoplasien zum Teil bereits zeigen. Die Kombination eines pan-PIM-Inhibitors mit einem dualen mTORC1/1-Inhibitor führte bei AML-Zelllinien zu einem erniedrigten Level an phosphoryliertem 4E-BP1 und phosphoryliertem S6K sowie bei einigen Zelllinien auch zu einer Herunterregulation von c-Myc [148]. Durch meine Ergebnisse kann die Erkenntnis bekräftigt werden, dass sowohl bei der Phosphorylierung von 4E-BP1 als auch bei der Expression der Proteine Mcl-1 und c-Myc mehrere Signalwege beteiligt sind und ein gemeinsamer Einsatz verschiedener Substanzen von Vorteil sein könnte. Die Hinweise auf die gemeinsame translationale Endstrecke der durch die Substanzen gehemmten Signalwege können durch diese Ergebnisse verstärkt werden.

4.3.2 Erklären Auswirkungen auf die cap-abhängige mRNA-Translation die beobachtete Proliferationshemmung?

Sowohl mTORC1-, PIM- und ERK-vermittelte Signale sind an der cap-abhängigen mRNA-Translation beteiligt. Die Substanzen RAD001 und Rituximab führen dazu, dass die Hyperphosphorylierung von 4E-BP1 nicht möglich ist und somit mehr mit eIF-4E gebundenes 4E-BP1 vorhanden ist. RAD001 hemmt mTORC1, welches normalerweise

4E-BP1 phosphoryliert [103,116,114]. Rituximab ermöglicht die hemmende Phosphorylierung durch seine Einflüsse auf den MAP-ERK-Signalweg [54,55]. Auch für LGB321 wird ein hemmender Einfluss auf mTORC1 vermutet [82].

Meine Hypothese war, dass die gleichzeitige Hemmung dieser drei Signalwege die cap-abhängige mRNA-Translation zum Erliegen bringen könnte. Gestärkt wird diese Hypothese durch die Ergebnisse aus den Versuchen zur Herunterregulation der Schlüsselproteine, die einen verstärkten Effekt bei der Kombination der drei Substanzen auf translational regulierte Proteine zeigten (siehe Abbildung 15).

Eine Aussage zur absoluten Effektivität der Kombination auf die Bildung des Translationsinitiationskomplexes eIF-4F und hierüber auf die cap-abhängige mRNA-Translation lässt sich durch den pull-down Assay nicht ermitteln. Mithilfe des Assays lassen sich Veränderungen in der relativen Menge der Proteine 4E-BP1 und eIF-4G1 anzeigen, die an eIF-4E gebunden sind. Das tatsächliche Verhältnis der an eIF-4E gebundenen Proteine lässt sich aber durch diese Methode nicht anzeigen. Eine weitere Fehlerquelle in der Anwendung des pull-down Assay ist, dass die zu untersuchenden Proteine sehr unterschiedliche Molekularmassen aufweisen. So ist eIF-4G1 mit 220 kDA sehr groß, während 4E-BP1 mit 22 kDA und eIF-4E mit 28 kDA Proteine mit einer kleinen Molekularmasse darstellen. Zwar können und müssen die Proteine für die erfolgreiche Durchführung des pull-down Assays alle auf einem Gel entwickelt werden, dies birgt jedoch das Risiko, dass die auf dem im Gel wandernden Proteinbanden bis zum Ende des Gels durchlaufen müssen und die Qualität des Blots darunter leiden kann.

Aufgrund meiner Ergebnisse ließ sich die Vermutung äußern, dass bei den hier untersuchten Zelllinien eine starke Aktivierung der cap-abhängigen mRNA-Translation vorlag (siehe Abbildung 16). Ein Hinweis dafür lieferte der pull-down Assay, welcher bei unbehandelten Zellen ein schwaches Signal für 4E-BP1 und ein starkes Signal für eIF-4G1 anzeigte.

Eine Erklärung für die verstärkte Aktivierung der cap-abhängigen mRNA-Translation bei ABC Zelllinien kann in der stärkeren Expression der PIM-Kinasen in diesem DLBCL-Subtyp liegen [19,137]. Es ist bekannt, dass PIM-Kinasen auf den Translationsinitiationsfaktor eIF-4B, welcher als Co-Faktor des eIF-4F-Komplexes gilt, durch eine aktivierende Phosphorylierung wirken und so die cap-abhängige mRNA-Translation direkt beeinflussen [158]. Der Einfluss von PIM-Inhibitoren auf cap-abhängige mRNA-Translation und die dadurch entstandene verminderte Expression

von c-Myc bei ABC-Zelllinien wurde bereits von Peters et al. beschrieben [138] und zeigte sich auch in meinen Untersuchungen.

Meine Analyse ergab aber auch, dass vor allem durch den Einsatz von RAD001 eine Reduktion der cap-abhängigen Translation erreicht werden konnte und dieser Effekt durch die Hinzunahme von LGB321 noch gesteigert werden konnte. Mit RAD001 bzw. LGB321 alleine und in Kombination ließ sich eine starke Abnahme von eIF-4G1 im Western Blot beobachten. Dies scheint ein Hinweis darauf zu sein, dass die cap-abhängige Translation zumindest teilweise durch die eingesetzten Substanzen gehemmt wird. Sowohl bei ABC- als auch bei GCB-Zelllinien ist der durch RAD001 verursachte Effekt auf die Translation bereits beschrieben [103, 114], der Effekt ist aber durch die Verwendung von BEZ235, einem PI3K-, mTORC1- und mTORC2-Inhibitor, deutlicher sichtbar [132].

Der Vorteil der Dreifachkombination in Bezug auf die Hemmung der cap-abhängigen mRNA-Translation ließ sich in meinen Ergebnissen jedoch nicht zeigen. Der Effekt von LGB321 und RAD001 gemeinsam auf eine Hemmung der cap-abhängigen mRNA-Translation ließ sich durch die zusätzliche Gabe von Rituximab nur geringgradig steigern. Trotzdem ist zu betonen, dass die Kombination dieser drei Substanzen möglicherweise Sinn macht. In meiner Arbeit zeigte sich sowohl für eine ABC- als auch für eine GCB-Zelllinie der stärkste Effekt mit gleichzeitig stärkstem 4E-BP1 Anstieg und eIF-4G1 Abfall im pull-down Assay als auch der nahezu vollständigen Herunterregulation cap-abhängig translatierter Proteine, Mcl-1 und c-Myc, in der Western Blot Analyse bei der Kombination aller drei Substanzen.

In meinem pull down-Assay ergaben sich außerdem Hinweise darauf, dass die für die eingesetzten Substanzen in der Literatur beschriebene Hemmung der Phosphorylierung von 4E-BP1 [55, 61, 95, 96] auch in meinem Zelllinienmodell nachweisbar ist. Bei der Behandlung mit den Substanzen zeigte sich im pull-down Assay bei jeder der drei Substanzen bei den untersuchten Zelllinien ein Anstieg von unphosphoryliertem 4E-BP1. Jedoch steht im Kontrast dazu, dass in den Western Blot-Analysen zur Herunterregulation der Schlüsselproteine (siehe Abbildung 15) nicht mit allen eingesetzten Substanzen alleine eine Abnahme von p4E-BP1 nachzuweisen war. Als Erklärung kann dienen, dass der in den Versuchsansätzen in Kapitel 3.6.2 verwendeten *Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) Antibody* nur zwei der vier Phosphorylierungsstellen von 4E-BP1 analysiert und somit trotz nicht darstellbarer Abnahme des Phosphorylierungsstatus mehr unphosphoryliertes 4E-BP1 in den Zellen vorliegen

könnte. Ein gleichzeitiger Abfall von eIF-4G1 zeigte sich nur bei bestimmten Kombinationen der Substanzen und könnte darauf deuten, dass durch eine einzelne Substanz sich zwar der Phosphorylierungsstatus von 4E-BP1 verändern lässt, dieser Einfluss aber zu gering ist und somit die Einzelsubstanz nur geringgradige Auswirkungen auf den Translationsinitiationskomplex hat. Die Hemmung der cap-abhängigen mRNA-Translation über 4E-BP1 scheint ein durch viele Einflüsse regulierter Faktor zu sein. Die molekularen Prozesse, die bei der Regulation der cap-abhängigen mRNA-Translation eine Rolle spielen, scheinen weiterhin nicht komplett verstanden zu sein. Andere Prozesse abseits der hier untersuchten Signalwege könnten zusätzlich einen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von 4E-BP1 und somit die Translationsregulation haben.

Daraus folgend wäre es sinnvoller einen Inhibitor einzusetzen, welcher direkt den Translationsinitiationskomplex eIF-4F oder einen der Faktoren des Komplexes hemmt und so zu einer Herunterregulation der cap-abhängigen mRNA-Translation führen könnte. Außerdem wäre eine Analyse der restlichen Translationsinitiationsfaktoren aufschlussreich mit der Fragestellung, ob diese in ihrer Funktion verändert sind. Zudem ist weiterhin fraglich, ob sich durch eine effektive Hemmung der cap-abhängigen mRNA-Translation die Proliferation von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* verhindern lässt und es zu einem Absterben der Zellen kommt oder die Zellen auf einen alternativen Weg der Translationsregulation ausweichen. Auch dieser Aspekt müsste in weiteren Untersuchungen vertieft werden.

Abschließend ist zu betonen, dass sich in meiner Arbeit mit der Kombination von LGB321 und RAD001 ein Effekt auf die Hemmung der cap-abhängigen Translation zeigte, dieser aber nicht durch die Hinzunahme von Rituximab verstärkt wurde. Jedoch sah man, möglicherweise aufgrund der verminderten Ausbildung des Translationsinitiationskomplexes, eine reduzierte Expressionsstärke von cap-abhängig translatierten Proteinen wie c-Myc und Mcl-1 und somit diesbezüglich einen Vorteil bei der Kombination der drei Substanzen (siehe Abbildung 15). Im Bezug auf die Proliferationshemmung und eventuell auch Apoptoseinduktion scheint es zwischen den drei Substanzen einen verstärkenden Effekt zu geben.

Somit bleibt der Kombinationsansatz weiterhin ein interessantes Gebiet mit Hinweisen auf eine gemeinsame translationale Endstrecke von LGB321 und RAD001 mit bei einigen Versuchen auch verstärkten Effekten der Dreifachkombination, aber keiner vollständige Hemmung aller Messparameter wie der Zellproliferation und des

Zellüberlebens. Zu bedenken ist, dass unter anderem beim Einsatz von Rituximab *in vitro* der Komplement-vermittelte Effekt und der Effekt von ADCC fehlen und somit die Wirkung abgeschwächt wird.

4.4 Ausblick

Ein wichtiges Fazit dieser Arbeit ist, dass Zelllinien des mit einer schlechten Prognose assoziierten ABC-Subtyp besser auf eine Behandlung mit PIM-Inhibitoren anzusprechen scheinen als Zelllinien des GCB-Subtyps. Die Proteinexpression der PIM-Kinasen ist in ABC-DLBCL gesteigert. PIM-Inhibitoren könnten daher möglicherweise eine Rolle in neuen Behandlungsansätzen für eine Subgruppenspezifische Therapie bei DLBCL spielen. Hierfür sind weitere Untersuchungen notwendig, die eine exakte Bestimmung, der auf PIM-Inhibitoren sensibel reagierenden Zelllinien, und im Verlauf auch Patienten, ermöglichen.

Außerdem ist der Einsatz von PIM-Inhibitoren bei Patienten mit DLBCL im Rahmen von Studien derzeit noch unerforscht. Lediglich Studien bei Patienten mit MM sind bis jetzt publiziert [87]. Wichtig wären Studien bei Patienten mit DLBCL und einer Therapie mit PIM-Inhibitoren, um Erkenntnisse über das Ansprechen *in vivo*, die Dosisfindung sowie die Verträglichkeit zu erhalten.

Ein limitierender Faktor für eine Monotherapie mit PIM-Inhibitoren ist jedoch, dass der Einsatz der Inhibitoren zu einer Zunahme von PIM-1 und PIM-2 führen könnte. Der Abbau der PIM-Kinasen erfolgt über eine, durch Autophosphorylierung gesteuerte, proteasomale Degradation [73]. Durch die Inhibitoren kommt es zu einer Hemmung des Degradationswegs und somit ist eine Zunahme der Proteine möglich. In einer bereits publizierten Arbeit über PIM-Inhibitoren bei ABC-Zelllinien ließ sich dieser Effekt jedoch nicht nachweisen [138]. Eine Kombination mit weiteren Inhibitoren bzw. Antikörpern erscheint vor diesem Hintergrund gerade um Resistenzbildungen vorzubeugen sinnvoll. In meinen *in vitro* Versuchen ließ sich die vermehrte Proliferationshemmung durch den gemeinsamen Einsatz der Substanzen nachweisen. Wichtig ist im nächsten Schritt zu erfahren, ob die Kombination auch bei aus Patientenproben extrahierten Zellen oder in Tiermodellversuchen eine Wirkung zeigt. Hierfür sind weiterführende Experimente mit der Kombination der Substanzen nötig.

Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg): Krebs in Deutschland 2011/2012 [Internet]. 10. Ausgabe. Berlin, 2015, 122. [zitiert am 25.05.2017]. URL: http://www.gekid.de/Doc/krebs_in_deutschland_2015.pdf
2. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin Lymphoma. *Lancet*. 2012;380(9844):848-57.
3. Frick M, Dörken B, Lenz G. The molecular biology of diffuse large B-cell lymphoma. *Ther Adv Hematol*. 2011;2(6):369-79.
4. Cultera JL, Dalia SM. Diffuse Large B-Cell-Lymphoma: Current Strategies and Future Directions. *Cancer Control*. 2012;19(3):204-13.
5. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2006;107(1):265-76, 2006.
6. Dörken B, Longo DD. Neoplasien des lymphatischen Systems. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M, eds. *Harrisons Innere Medizin Band 1*, 17th ed. Berlin, Germany: ABW Wissenschaftsverlag, 2009,857-73.
7. Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;87(2):146-71.
8. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GH, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.
9. In: Stein H, Warnke RA, Chan WC, Jaffe ES, Chan JKS, Gatter KC, Campo E. Diffuse large B Cell Lymphoma not otherwise specified. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, Hrsg. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: WHO Classification of Tumours; 2008:233-237.
10. Jaffe ES, Pittaluga S. Aggressive B-cell lymphomas: a review of new and old entities in the WHO classification. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:506-14.
11. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the committee on Hodgkin`s disease staging classification. *Cancer Research*. 1971;31(11):1860-1.
12. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, Rosenberg SA, Coltman CA, Tubiana M. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin`s disease. Cotswolds Meeting. *J Clin Oncol*. 1989;7(11):1630-6.
13. Shipp MA. Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: who has "high-risk" disease? *Blood*. 1994;83(5):1165-73.
14. Deutsche Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome: Aktive Studien. Risikoadaptierte Studien für DLBCL. [Internet]. 01/2014 [zitiert am 03.06.2017]. URL: <http://www.dshnhl.org/studien/aktive-studien/>
15. A predictive model for aggressive non-Hodgkin`s Lymphoma. The International Non-Hodgkin`s Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*. 1993;329(14):987-94.
16. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, Pfreundschuh M, Loeffler M. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2372-80.
17. Pfreundschuh M, Ho AD, Cavallin-Stahl E, Wolf M, Pettengell R, Vasova I, Belch A, Walewski J, Zinzani PL, Mingrone W, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Corrado C, Scheliga A, Loeffler M, Kuhnt E, MabThera International Trial (MInT) Group. Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in patients with good-prognosis diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group (MInt) study. *Lancet Oncol*. 2008;9(5):435-44.
18. Ott G, Ziepert M, Klapper W, Horn H, Szczepanowski M, Bernd HW, Thorns C, Feller AC, Lenze D, Hummel M, Stein H, Müller-Hermelink HK, Frank M, Hansmann ML, Barth TF, Möller P, Cogliatti S, Pfreundschuh M, Schmitz N, Trümper L, Loeffler M, Rosenwald A. Immunoblastic morphology but not immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood*. 2010;116(23):4916-25.
19. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti

- GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.
20. Lenz G, Staudt LM. Aggressive Lymphomas. *N Engl J Med*. 2010;362(15):1417-29.
21. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltnane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, López-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Kraici P, Stokke T, Staudt LM. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(25):1937-47.
22. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW, Dave SS, Zhao H, Xu W, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Chan WC, Staudt LM. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*. 2008;319(5870):1676-9.
23. Greiner TC, Patel K, Dave BJ, Smith L, Ji J, Wright G, Sanger WG, Pickering DL, Jain S, Horsman DE, Shen Y, Fu K, Weisenburger DD, Hans CP, Campo E, Gascoyne RD, Rosenwald A, Jaffe ES, Delabie J, Rimsza L, Ott G, Muller-Hermelink HK, Connors JM, Iqbal J, Vose JM, McKeithan T, Staudt LM, Chan WC and Leukemia/Lymphoma Molecular Profiling Project (LLMPP). Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2007;21(11):2332-43.
24. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, Kohlhammer H, Lamy L, Zhao H, Yang Y, Xu W, Shaffer AL, Wright G, Xiao W, Powell J, Jiang JK, Thomas CJ, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Johnson NA, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Wilson WH, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Pierce SK, Staudt LM. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;463(7277):88-92.
25. Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinalcentre B cells. *Nature*. 2004;432(7017):635-9.
26. Lossos IS, Alizadeh AA, Eisen MB, Chan WC, Brown PO, Botstein D, Staudt LM, Levy R. Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 97(18):10209-13.
27. Lenz G, Wright GW, Emre NCT, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, Carty S, Lam LT, Shaffer AL, Xiao W, Powell J, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Rimsza LM, Fisher RI, Weisenburger DD, Chan WC, Staudt LM. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(36):13520-5.
28. Pfeifer M, Grau M, Lenze D, Wenzel SS, Wolf A, Wollert-Wulf B, Dietze K, Nogai H, Storek B, Madle H, Dörken B, Janz M, Dirnhofer S, Lenz P, Hummel M, Tzankov A, Lenz G. PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(30):12420-5.
29. Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee AH, Qian SB, Zhao H, Yu X, Yang L, Tan BK, Rosenwald A, Hurt EM, Petroulakis E, Sonenberg N, Yewdell JW, Calame K, Glimcher LH, Staudt LM. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*. 2004;21(1):81-93.
30. Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J, Monti S, Grunn A, Nandula SV, Aster JC, Murty VV, Shipp MA, Dalla-Favera R. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J. Exp. Med*. 2006;203(2):311-7.
31. Shaffer AL 3rd, Young RM, Staudt LM. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:565-610.
32. Ding BB, Yu JJ, Yu RY, Mendez LM, Shaknovich R., Zhang Y, Cattoretti G, Ye BH. Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2008;111(3):1515-23.
33. Lam LT, Wright G, Davis RE, Lenz G, Farinha P, Dang L, Chan JW, Rosenwald A, Gascoyne RD, Staudt LM. Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- κ B

pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2008;111(7):3701-13.

34. Baeuerle PA, Baltimore D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*. 1988;242(4878):540-6

35. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim KH, Kohlhammer H, Xu W, Yang Y, Zhao H, Shaffer AL, Romesser P, Wright G, Powell J, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Ott G, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Staudt LM. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011;470(7332):115-9.

36. Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, Bertoni F, Ponzoni M, Scandurra M, Califano A, Bhagat G, Chadburn A, Dalla-Favera R, Pasqualucci L. Mutations of multiple genes cause deregulation of NFkappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2009;459(7247):717-21.

37. Diffuses großzelliges B-Zelllymphom (DLBCL). In: Herold G, Hrsg. *Innere Medizin*. Köln: Herold, Gerd; 2015: 82.

38. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, Glick JH, Coltman CA, Miller TP. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med*. 1993;328(14):1002-6.

39. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepage G, Plantier I, Castaigne S, Lefort S, Marit G, Macro M, Sebban C, Belhadj K, Bordessoule D, Ferme C, Tilly H. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*. 2010;116(12):2040-5.

40. Maloney DG. Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2012;366(21):2008-16.

41. Tomita A. Genetic and Epigenetic Modulation of CD20 Expression in B-Cell Malignancies: Molecular Mechanisms and Significance to Rituximab Resistance. *J Clin Exp Hematop*. 2016;56(2):89-99.

42. National Library of Medicine, National Institutes of Health. A Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of MOR208 With Bendamustine (BEN) Versus Rituximab (RTX) With BEN in Adult Patients With Relapsed or Refractory Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL) (B-MIND) [Internet]. Februar 2017

[zitiert am xx.0x.2016]. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02763319?term=mor208+dlbcl&rank=1>

43. National Library of Medicine, National Institutes of Health. A Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Lenalidomide With MOR00208 in Patients With R-R DLBCL (L-MIND) [Internet]. Dezember 2016 [zitiert am xx.0x.2016]. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02399085?term=mor208+dlbcl&rank=2>

44. Davies AJ, Caddy J, Maishman T, Barrans S, Mamot C, Care M, Pocock C, Stanton L, Hamid D, Pugh K, McMillan A, Fields P, Kruger A, Jack A, Johnson PWM. A Prospective Randomised Trial of Targeted Therapy for Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) Based upon Real-Time Gene Expression Profiling: The Remodl-B Study of the UK NCRI and SAKK Lymphoma Groups (ISRCTN51837425). *Blood*. 2015;126:812

45. Maurer MJ, Link BK, Habermann TM, Thompson CA, Allmer C, Johnston PB, Micallef I, Inwards DJ, Farooq U, Macon WR, Syrbu S, Feldman AL, Slager SL, Weiner GJ, Ansell S, Cerhan JR, Witzig TE, Nowakowski GS. Time from Diagnosis to Initiation of Treatment of DLBCL and Implication for Potential Selection Bias in Clinical Trials. In: *ASH 58th Annual Meeting & Exposition, 2016*. San Diego, USA, 03.-06. Dezember 2016:3034

46. Chiappella A, Franceschetti S, Carella AM, Baldi I, Inghirami G, Spina M, Pavone V, Ladetto M, Liberati AM, Molinari AL, Zinzani P, Salvi F, Fattori PP, Zaccaria A, Dreyling M, Botto B, Castellino A, Congiu A, Gaudiano M, Zanni M, Ciccone G, Vitolo U, Gaidano G, Rossi G, Fondazione Italiana Linfomi. Lenalidomide plus R-CHOP21 in elderly patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: results of the REAL07 open-label, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(7):730-7.

47. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-82.

48. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-7.

49. Foon KA. Monoclonal Antibody Therapies for lymphomas. *Cancer J*. 2000;6(5):273-8.

50. Johnson PW, Glennie MJ. Rituximab: mechanisms and applications. *Br J Cancer*.

- 2001;85(11):1619-23.
51. Leget GA, Czuczman MS. Use of rituximab, the new FDA-approved antibody. *Curr Opin Oncol.* 1998;10(6):548-51.
52. Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Wong PW, Ultsch M, Meng G, Mulkerrin MG. Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J Immunol.* 2000;164(8):4178-84.
53. Uchida J, Hamaguchi Y, Oliver JA, Ravetch JV, Poe JC, Haas KM, Tedder TF. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med.* 2004;199(12):1659-69.
54. Kheirallah S, Caron P, Gross E, Quillet-Mary A, Bertrand-Michel J, Fournié JJ, Laurent G, Bezombes C. Rituximab inhibits B-cell receptor signaling. *Blood.* 2010;115(5):985-94.
55. Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunosensitivity, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. *Oncogene.* 2007;26(25):3629-36.
56. Kubuschok B, Held G, Pfreundschuh M. Management of Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL). In: Evens AM, Blum KA, Hrsg. *Non-Hodgkin Lymphoma. Pathology, Imaging, and Current Therapy.* 165. Heidelberg: Springer; 2015: 271-88.
57. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, Bodkin DJ, White CA, Liles TM, Royston I, Varns C, Rosenberg J, Levy R. IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 1997;15(10):3266-74.
58. Yang H, Rosove MH, Figlin RA. Tumor lysis syndrome occurring after the administration of rituximab in lymphoproliferative disorders: high-grade non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Am J Hematol.* 1999;62(4):247-50.
59. Cuypers HT, Selten G, Quint W, Zijlstra M, Maandag ER, Boelens W, van Wezenbeek P, Melief C, Berns A. Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell.* 1984;37(1):141-50.
60. Amaravadi R, Thompson CB. The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2618-24.
61. Nawijn MC, Alendar A, Berns A. For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(1):23-34.
62. Fujii C, Nakamoto Y, Lu P, Tsuneyama K, Popivanova BK, Kaneko S, Mukaida N. Aberrant expression of serine/threonine kinase Pim-3 in hepatocellular carcinoma development and its role in the proliferation of human hepatoma cell lines. *Int J Cancer.* 2005;114(2):209-18.
63. Mukaida N, Wang YY, Li YY. Roles of Pim-3, a novel survival kinase, in tumorigenesis. *Cancer Sci.* 2011;102(8):1437-42.
64. Popivanova BK, Li Y, Zheng H, Omura, Fujii C, Tsuneyama K, Mukaida N. Protooncogene, Pim-3 with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human colon cancer cells and can prevent Bad-mediated apoptosis. *Cancer Sci.* 2007;98(3):321-8.
65. Beier UH, Weise JB, Laudien M, Sauerwein H, Görögh T. Overexpression of Pim-1 in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Oncol.* 2007;30(6):1381-7.
66. Cibull TL, Jones TD, Li L, Eble JN, Ann Baldrige L, Malott SR, Luo Y, Cheng L. Overexpression of Pim-1 during progression of prostatic adenocarcinoma. *J Clin Pathol.* 2006;59(3):285-8.
67. Gomez-Abad C, Pisonero H, Blanco-Aparicio C, Roncador G, Gonzalez-Menchen A, Martinez-Climent JA, Mata E, Rodriguez ME, Munoz-Gonzalez G, Sanchez-Beato M, Leal JF, Bischoff JR, Piris MA. PIM2 inhibition as a rational therapeutic approach in B-cell lymphoma. *Blood.* 2011;118(20):5517-27.
68. Yang Q, Chen LS, Neelapu SS, Miranda RN, Medeiros LJ, Gandhi V. Transcription and translation are primary targets of Pim kinase inhibitor SGI-1776 in mantle cell lymphoma. *Blood.* 2012;120(17):3491-500.
69. Zhus N, Ramirez LM, Lee RL, Magnuson NS, Bishop GA, Gold MR. CD40 Signaling in B Cells regulates the expression of the Pim-1 Kinase Via the NF- κ B Pathway. *J Immunol.* 2002;168(2):744-54.
70. Yip-Schneider MT, Horie M, Broxmeyer HE. Transcriptional induction of pim-1 protein kinase gene expression by interferon gamma and posttranscriptional effects on costimulation with steel factor. *Blood.* 1995;85(12):3494-502
71. Hostager BS, Bishop GA. CD40-Mediated Activation of the NF- κ B Pathway. *Front Immunol.* 2013;4:376.
72. Brault L, Gasser C, Bracher F, Huber K, Knapp S, Schwaller J. PIM serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers. *Haematologica.* 2010;95(6):1004-15.
73. Ma J, Arnold HK, Lilly MB, Sears RC, Kraft A. Negative regulation of Pim-1 protein kinase

- levels by the B56 β subunit of PP2A. *Oncogene*. 2007;26(35):5145-53.
74. Hermeking H, Eick D. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science*. 1994;265(5181):2091-3.
75. Chuang LS, Ito K, Ito Y. RUNX family: Regulation and diversification of roles through interacting proteins. *Int J Cancer*. 2013;132(6):1260-71
76. Lu J, Zavorotinskaya T, Dai Y, Niu XH, Castillo J, Sim J, Yu J, Wang Y, Langowski JL, Holash J, Shannon K, Garcia PD. Pim2 is required for maintaining multiple myeloma cell growth through modulating TSC2 phosphorylation. *Blood*. 2013;122(9):1610-20.
77. De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene*. 2004;23(18):3189-99.
78. Zhang Y, Wang Z, Magnuson NS. Pim-1 kinase-dependent phosphorylation of p21Cip1/WAF1 regulates its stability and cellular localization in H1299 cells. *Mol Cancer Res*. 2007;5(9):909-22.
79. Mikkers H, Nawijn M, Allen J, Brouwers C, Verhoeven E, Jonkers J, Berns A. Mice deficient for all PIM kinases display reduced body size and impaired responses to hematopoietic growth factors. *Mol Cell Biol*. 2004;24(13):6104-15.
80. Liu Y, Agrawal NJ, Radhakrishnan R. A flexible-protein molecular docking study of the binding of ruthenium complex compounds to PIM1, GSK-3 β , and CDK2/Cyclin A protein kinases. *J Mol Model*. 2013;19(1):371-82.
81. Chen LS, Redkar S, Bearss D, Wierda WG, Gandhi V. Pim kinase inhibitor, SGI-1776, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2009;114(19):4150-7.
82. Garcia PD, Langowski JL, Wang Y, Chen M, Castillo J, Fanton C, Ison M, Zavorotinskaya T, Dai Y, Lu J, Niu XH, Basham S, Chan J, Yu J, Doyle M, Feucht P, Warne R, Narberes J, Tsang T, Fritsch C, Kauffmann A, Pfister E, Drueckes P, Trappe J, Wilson C, Han W, Lan J, Nishiguchi G, Lindvall M, Bellamacina C, Aycinena JA, Zang R, Holash J, Burger MT. Pan-PIM kinase inhibition provides a novel therapy for treating hematologic cancers. *Clin Cancer Res*. 2014;20(7):1834-45.
83. Schatz JH, Oricchio E, Wolfe AL, Jiang M, Linkov I, Maragulia J, Shi W, Zhang Z, Rajasekhar VK, Pagano NC, Porco JA Jr, Teruya-Feldstein J, Rosen N, Zelenetz AD, Pelletier J, Wendel HG. Targeting cap-dependent translation blocks converging survival signals by AKT and PIM kinases in lymphoma. *J Exp Med*. 2011;208(9):1799-807.
84. Chen LS, Redkar S, Taverna P, Cortes JE, Gandhi V. Mechanisms of cytotoxicity to pim kinase inhibitor, SGI-1776, in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011;118(3):693-702.
85. National Library of Medicine, National Institutes of Health. Safety of SGI-1776, a PIM Kinase Inhibitor in Refractory Prostate Cancer and Relapsed/Refractory Non Hodgkin's Lymphoma [Internet]. Dezember 2011 [zitiert am 12.01.2017]. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00848601>
86. National Library of Medicine, National Institutes of Health. Study of SGI-1776, a PIM Kinase Inhibitor, in Subjects With Relapsed/Refractory Leukemias [Internet]. September 2012 [zitiert am 12.01.2017]. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01239108>
87. Raab M, Ocio E, Thomas S, Gunther A, Goh Y-T, Lebovic D, Jakubowiak AJ, Song D, Ziang F, Patel A, Vanasse KG, Kumar S. Phase 1 Study Update of the Novel Pan-Pim Kinase Inhibitor LGH447 in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Blood*. 2014;124:301.
88. Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(3):195-203.
89. Whitman M, Downes CP, Keeler M, Keller T, Cantley L. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature*. 1988;332(6165):644-6.
90. Zhao MY, Auerbach A, D'Costa AM, Rapoport AP, Burger AM, Sausville EA, Stass SA, Jiang F, Sands AM, Aguilera N, Zhao XF. Phospho-p70S6K/p85S6K and cdc2/cdk1 are novel targets for diffuse large B-cell lymphoma combination therapy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(5):1708-20.
91. Wanner K, Hipp S, Oelsner M, Ringshausen I, Bogner C, Peschel C, Decker T. Mammalian target of Rapamycin inhibition induces cell cycle arrest in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) cells and sensitises DLBCL cells to Rituximab. *Br J Haematol* 2006;134(5):475-84.
92. Schlessinger J. Cell signalling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000;103(2):211-25.
93. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002;296(5573):1655-7.
94. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):489-501.
95. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*. 2004;30(2):193-204.

96. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(12):921-9.
97. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 2004;9(6):667-76.
98. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*. 2007;12(1):9-22.
99. Peterson TI, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. DEPTOR is an mTOR Inhibitor Whose Frequent Overexpression in Multiple Myeloma Cells Promotes their Survival. *Cell*. 2009;137(5):873-86.
100. Hsieh AC, Costa M, Zollo O, Davis C, Feldman ME, Testa JR, Meyuhas O, Shokat KM, Ruggero D. Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell*. 2010;17(3):249-61.
101. Thomas LW, Lam C, Edwards SW. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett*. 2010;584(14):2981-9.
102. Luo J. Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett*. 2009;273(2):194-200.
103. Houghton PJ. Everolimus. *Clin Cancer Res*. 2010;16(5):1368-72.
104. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Kay A, Ravaud A; RECORD-1 Study Group. Phase 3 trial of everolimus für metastatic renal cell carcinoma: final result and analysis of prognostic factors. *Cancer*. 2010;116(18):4256-65.
105. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Öberg K; RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumors, Third Trial (RADIANT-3) Study Group. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2011;364(6):514-23.
106. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA 3rd, Rugo HS, Sahmoud T, Noguchi S, Gnant M, Pritchard KI, Lebrun F, Beck JT, Ito Y, Yardley D, Deleu I, Perez A, Bachelot T, Vittori L, Xu Z, Mukhopadhyay P, Lebwohl D, Hortobagyi GN. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366(6):520-9.
107. Franz DN, Belousova E, Sparagana S, Bebin EM, Frost M, Kuperman R, Witt O, Kohrman MH, Flamini JR, Wu JY, Curatolo P, de Vries PJ, Berkowitz N, Anak O, Niolat J, Jozwiak S. Everolimus for subependymal giant cell astrocytoma in patients with tuberous sclerosis complex: 2-year open-label extension of the randomised EXIST-1 study. *Lancet Oncol*. 2014;15(13):1513-20.
108. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc*. 2003;35(3):7-14.
109. Camardo J. The rapamune era of immunosuppression 2003: the journey from the laboratory to clinical transplantation. *Transplant Proc*. 2003;35(3):18-24.
110. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*. 1991;253(5022):905-9.
111. Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature*. 1989;341(6244):758-60.
112. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-independent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*. 1994;78(1):35-43.
113. Lui P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(8):627-44.
114. Martin DE, Hall MN. The expanding TOR signaling network. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17(2):158-66.
115. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006;22(2):159-68.
116. Panwalkar A, Verstovsek S, Giles FJ. Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer*. 2004;100(4):657-66.
117. Merli M, Ferrario A, Maffioli M, Arcaini L, Passamonti F. Everolimus in diffuse large B cell lymphomas. *Future Oncol*. 2015;11(3):373-83.
118. Smith SM, van Besien K, Karrison T, Dancey J, McLaughlin P, Younes A, Smith S, Stiff P, Lester E, Modi S, Doyle LA, Vokes EE, Pro B. Temsirolimus has activity in non-mantle cell non-Hodgkin's lymphoma subtypes: The University of Chicago phase II consortium. *J Clin Oncol*. 2010;28(31):4740-6.
119. Johnston PB, LaPlant B, McPhail E, Habermann TM, Inwards DJ, Micallef IN, Colgan JP, Nowakowski GS, Ansell SM, Witzig TE. Everolimus combined with R-

- CHOP-21 for new, untreated, diffuse large B-cell lymphoma (NCCTG 1085 [Alliance]): safety and efficacy results of a phase 1 and feasibility trial. *Lancet Haematol.* 2016;3(7):e309-16.
120. Proteinbiosynthese und Proteinmodifikation. In: Löffler G, Hrsg. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.* 7. Aufl. Heidelberg: Springer; 2008:265-83.
121. Kozak M. How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell.* 1978;15(4):1109-23.
122. Chaudhuri J, Chowdhury D, Maitra U. Distinct functions of eukaryotic translation initiation factors eIF1A and eIF3 in the formation of the 40 S ribosomal preinitiation complex. *J Biol Chem.* 1999;274(25):17975-80.
123. Majumdar R, Bandyopadhyay A, Maitra U. Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex. *J Biol Chem.* 2003;278(8):6580-7.
124. Pestova TV, Borukhov SI, Hellen CU. Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature.* 1998;394(6696):854-9.
125. Das S, Ghosh R, Maitra U. Eukaryotic translation initiation factor 5 functions as a GTPase-activating protein. *J Biol Chem.* 2001;276(9):6720-6.
126. Sonenberg N, Rupprecht KM, Hecht SM, Shatkin AJ. Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on sepharose-coupled m7GDP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4345-9.
127. Sonenberg N. Cap-binding proteins of eukaryotic messenger RNA: functions in initiation and control of translation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1988;35:173-207.
128. Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell.* 1998;2(1):135-40.
129. Pestova TV, Kolupaeva VG. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev.* 2002;16(22):2906-22.
130. Pestova TV, Lomakin IB, Lee JH, Choi SK, Dever TE, Hellen CU. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature.* 2002;403(6767):332-5.
131. Hess G, Herbrecht R, Romaguera J, Verhoef G, Crump M, Gisselbrecht C, Laurell A, Offner F, Strahs A, Berkenblit A, Hanushevsky O, Clancy J, Hewes B, Moore L, Coiffier B. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2009; 27(23):3822-9.
132. Zang C, Eucker J, Liu H, Müller A, Possinger K, Scholz CW. Concurrent inhibition of PI3-kinase and mTOR induces cell death in diffuse large B cell lymphomas, a mechanism involving down regulation of Mcl-1. *Cancer Lett.* 2013;339(2):288-97.
133. Buske C, Hutchings M, Dreyling M, Gaidano G, Le Gouill S, Luminari S, Pott C, Zamò A, Zucca E Ladetto M; ESMO Lymphoma Consensus Conference Panel Members. ESMO consensus conference on malignant lymphoma: general perspectives and recommendations for prognostic tools in mature B-cell lymphomas and chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol.* 2016;27(12):2149-60.
134. Davies AJ, Barrans S, Maishman T, Cummin TE, Bentley M, Mamot C, Novak U, Caddy J, Hamid D, Kazmi-Stokes SH, MacMillan A, Fields PA, Pocock C, Kruger A, Collins G, Sha C, Clipson A, Wang M, Tooze RM, Care MA, Griffiths GO, Du M, Westhead DR, Burton C, Jack A, Johnson PW. Differential efficacy of bortezomib in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma: A prospective randomised study stratified by transcriptome profiling. The REMoDL-B Study of the UK NCRI and SAKK Lymphoma Groups. In: 14th International Conference of Malignant Lymphoma, 2017. Online Abstract Book. Lugano, Schweiz, 14.-17.Juni 2017:121.
135. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science.* 2007;316(5827):1039-43.
136. Eroglu Z, Ribas A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. *Ther Adv Med Oncol.* 2016;8(1):48-56.
137. Braut L Menter T, Obermann EC, Knapp S, Thommen S, Schwaller J, Tzankov A. PIM kinases are progression markers and emerging therapeutic targets in diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Cancer.* 2012;107(3):491-500.
138. Peters TL, Li L, Tula-Sanchez AA, Pongtornpipat P, Schatz JH. Control of translational activation by PIM kinase in activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma confers sensitivity to inhibition by PIM447. *Oncotarget.* 2016;7(39):63362-73.
139. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple Myeloma. *Lancet.* 2009;374(9686):324-39.

140. Matthews GM, de Matos Simoes R, Dhimolea E, Sheffer M, Gandolfi S, Dashevsky O, Sorrell JD, Mitsiades CS. NF- κ B dysregulation in multiple myeloma. *Semin Cancer Biol.* 2016;39:68-76.
141. Zhang LH, Kosek J, Wang M, Heise C, Schafer PH, Chopra R. Lenalidomide efficacy in activated B-cell-like subtype diffuse large B cell lymphoma is dependent upon IRF4 and cereblon expression. *Br J Haematol.* 2013;160(4):487-502.
142. Mathas S, Rickers A, Bommert K, Dörken B, Mapara MY. Anti-CD20- and B-cell receptor-mediated apoptosis: evidence for shared intracellular signaling pathways. *Cancer Res.* 2000;60(24):7170-6.
143. Teeling JL, French RR, Cragg MS, van den Brakel J, Pluyter M, Huang H, Chan C, Parren PW, Hack CE, Dechant M, Valerius T, van de Winkel JG, Glennie MJ. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood.* 2004;104(6):1793-800.
144. Perz J, Topaly J, Fruehauf S, Hensel M, Ho AD. Level of CD 20-expression and efficacy of rituximab treatment in patients with resistant or relapsing B-cell prolymphocytic leukemia and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2002;43(1):149-51.
145. Xu ZZ, Wang WF, Fu WB, Wang AH, Liu ZY, Chen LY, Guo P, Li JM. Combination of rituximab and mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(5):1151-7.
146. Barnes JA, Jacobsen E, Feng Y, Freedman A, Hochberg EP, LaCasce AS, Armand P, Joyce R, Sohani AR, Rodig SJ, Neuberg D, Fisher DC, Abramson JS. Everolimus in combination with rituximab induces complete responses in heavily pretreated diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica.* 2013;98(4):615-9.
147. Kuo HP, Ezell SA, Hsieh S, Schweighofer KJ, Cheung LWK, Wu S, Apatira M, Sirisawad M, Eckert K, Liang Y, Hsu J, Chen CT, Beaupre D, Chang BY. The role of PIM1 in the ibrutinib-resistant ABC subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Cancer Res.* 2016; 6(11): 2489–2501.
148. Harada M, Benito J, Yamamoto S, Kaur S, Arslan D, Ramirez S, Jacamo R, Plataniias L, Matsushita H, Fujimura T, Kazuno S, Tabe Y, Konopleva M. The novel combination of dual mTOR inhibitor AZD2014 and pan-PIM inhibitor AZD1208 inhibits growth in acute myeloid leukemia via HSF pathway suppression. *Oncotarget.* 2015;6(35):37930-47.
149. Cervantes-Gomez F, Lavergne B, Keating MJ, Wierda WG, Gandhi V. Combination of Pim kinase inhibitors and Bcl-2 antagonists in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 2015;2(57):1-9.
150. Smith SM, van Besien K, Karrison T, Dancey J, McLaughlin P, Younes A, Smith S, Stiff P, Lester E, Modi S, Doyle LA, Vokes EE, Pro B. Temsirolimus has activity in non-mantle cell non-Hodgkin's lymphoma subtypes: The University of Chicago phase II consortium. *J Clin Oncol.* 2010;28(31):4740-6.
151. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):76-100.
152. McCarthy A, Marzec J, Clear A, Petty RD, Coutinho R, Matthews J, Wilson A, Iqbal S, Calaminici M, Gribben JG, Jia L. Dysregulation of autophagy in human follicular lymphoma is independent of overexpression of BCL-2. *Oncotarget.* 2014;5(22):11653-68.
153. Lindqvist LM, Heinlein M, Huang DC, Vaux DL. Prosurvival Bcl-2 family members affect autophagy only indirectly, by inhibiting Bax and Bak. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(23):8512-7.
154. Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(4):304-12.
155. Limon JJ, Fruman DA. Akt and mTOR in B Cell Activation and Differentiation. *Front Immunol.* 2012;3:228.
156. Young RM, Shaffer AL 3rd, Phelan JD, Staudt LM. B cell Receptor Signaling in Diffuse Large B cell Lymphoma. *Semin Hematol.* 2015;52(2):77-85.
157. Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(45):17414-9.
158. Yang J, Wang J, Chen K, Guo G, Xi R, Rothman PB, Whitten D, Zhang L, Huang S, Chen JL. eIF4B phosphorylation by pim kinases plays a critical role in cellular transformation by Abl oncogenes. *Cancer Res.* 2013;73(15):4898-908.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Kira-Denise Golze, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „PIM-Signalnetzwerk bei Zelllinien diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome“ 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.

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

Berlin, 05.09.2017

Kira-Denise Golze

Lebenslauf

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

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater PD Dr. med. Christian Scholz für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für seine unermüdliche intensive und hilfreiche Unterstützung während der Erarbeitung dieser Dissertation. Vielen Dank für die regelmäßige Diskussion meiner Ergebnisse, für neue Anregungen für das experimentelle Vorgehen, sowie die fachkundigen Ratschläge zur Problemlösung. Sein vertrauensvoller Beistand hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch für seine mehrfache mühevollen Durchsicht dieser Arbeit sowie die kritischen Verbesserungsanregung bin ich sehr dankbar. Besonders aufrichtig danken möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Chuanbing Zang sowie Frau Dr. rer. nat. Hongyu Liu für die ausgezeichnete und geduldige Einarbeitung im Labor. Ihnen verdanke ich sämtliche Kenntnisse der methodischen Grundlagen. Ich konnte mich jederzeit mit Fragen an sie wenden und sie standen mir auch in stressigsten Laborzeiten mit Rat und Tat zur Seite und brachten mich mit konstruktiver Kritik weiter.

Herrn Prof. Dr. med. Georg Lenz, zu diesem Zeitpunkt an der Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie Charité Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow-Klinikum, und Herrn Dr. Hans Guido Wendel aus dem Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York möchte ich für die zur Verfügung gestellten Zelllinien danken.

Frau Prof. Dr. med. Minoo Lenarz, zu diesem Zeitpunkt Direktorin der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am Campus Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin, und ihrem Team danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Lymphknotenproben.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, allen voran meiner Mutter, Birgit Golze, die mir mein Studium durch ihre stetige uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung ermöglicht hat und mich stets bestärkt und aufgerichtet hat, wenn ich an mir gezweifelt habe.

Meinem Freund Dennis Hahn danke ich von ganzem Herzen für seinen starken emotionalen Rückhalt. Vielen Dank für die stetige Motivation, das Aushalten meiner schlechten Laune und strapazierten Nerven sowie die Bemühung jederzeit für die erforderliche Ablenkung zu sorgen.