
Aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie
(Prof. Dr. med. L. Trümper)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Tyrosinkinaseinhibition bei humanen Non-Hodgkin-Lymphomen:
Präklinische Evaluation von Sorafenib**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Nikolai Schuelper

aus

Lübeck

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. G. Wulf

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands

Tag der mündlichen Prüfung: 30. November 2010

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Aggressive Lymphome | 1 |
| 1.2 Therapeutische Tyrosinkinaseinhibition | 3 |
| 1.3 Sorafenib..... | 4 |
| 1.4 Zielsetzung und Fragestellung..... | 7 |
| 2 Material, Methoden und Patientenproben | 8 |
| 2.1 Material..... | 8 |
| 2.1.1 Geräte | 8 |
| 2.1.2 EDV..... | 9 |
| 2.1.3 Verbrauchsmaterialien | 10 |
| 2.1.4 Chemikalien | 11 |
| 2.1.5 Kits | 12 |
| 2.1.6 Proteine, Proteinaseinhibitoren und Proteinstandards..... | 13 |
| 2.1.7 Antikörper | 13 |
| 2.1.7.1 Primärantikörper..... | 13 |
| 2.1.7.2 Sekundärantikörper | 13 |
| 2.1.8 Versuchssubstanz Sorafenib..... | 14 |
| 2.1.9 Medien für die Zellkultur..... | 14 |
| 2.1.10 Zelllinien | 14 |
| 2.2 Zellbiologische Methoden..... | 15 |
| 2.2.1 Zellzahlbestimmung mit Neubauer-Zählkammer | 15 |
| 2.2.2 Zellzahlbestimmung mit CASY | 15 |
| 2.2.3 Kultivieren von Zellen | 15 |
| 2.2.4 Kryokonservierung von Zellen | 16 |
| 2.2.5 Revitalisieren von Zellen | 16 |
| 2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS)..... | 16 |
| 2.2.7 Zytotoxizitäts-Assays..... | 17 |
| 2.2.7.1 MTT-Test..... | 17 |
| 2.2.7.2 Annexin-V-Fluos / PI-Färbung..... | 18 |
| 2.2.7.3 Langzeitkulturen | 19 |
| 2.2.8 Klonogenitätstest - Colony Formation Unit (CFU) | 19 |
| 2.2.9 Zellzyklusanalyse..... | 19 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.3 | Proteinbiochemische Methoden..... | 20 |
| 2.3.1 | Herstellung der Western-Blot-Lysate..... | 20 |
| 2.3.2 | Proteinbestimmung nach BioRad DC Protein Assay | 21 |
| 2.3.3 | LDS-Gelelektrophorese | 22 |
| 2.3.4 | Nassblot auf Nitrozellulosemembranen | 22 |
| 2.3.5 | Immundetektion | 23 |
| 2.3.6 | Kinase Screen Array mit R&D Proteom Profiler™ Array..... | 24 |
| 2.4 | Statistische Analysen | 25 |
| 2.4.1 | Two-way ANOVA mit Bonferroni-Posttest..... | 25 |
| 2.4.2 | Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Posttest | 25 |
| 2.5 | Patientenproben | 25 |
| 3 | Ergebnisse | 26 |
| 3.1 | Identifizierung von Sorafenib-Zielstrukturen in einem Panel von aggressiven Lymphomen | 26 |
| 3.2 | Analyse der zytotoxischen Wirkung von Sorafenib nach Kurzzeitexposition | 29 |
| 3.2.1 | MTT-Test | 29 |
| 3.2.2 | Apoptose | 31 |
| 3.2.3 | Zellzyklus | 33 |
| 3.3 | Untersuchung nach Langzeitexposition von Sorafenib | 36 |
| 3.3.1 | Wachstum unter Langzeitexposition | 36 |
| 3.3.2 | Apoptose | 38 |
| 3.3.3 | Klonogenität | 38 |
| 3.4 | Identifizierung des Mechanismus..... | 40 |
| 3.4.1 | Western-Blot unter Sorafenibexposition für klassische Targets | 40 |
| 3.4.2 | Array zur Identifizierung neuer Targets | 41 |
| 3.4.3 | Bestätigungs-Blots | 45 |
| 3.5 | Patientenproben | 45 |
| 3.5.1 | Zytotoxische Wirkung von Sorafenib auf Patientenproben | 45 |
| 3.5.2 | Überprüfung der Sorafenib-Zielstrukturen in Patientenproben | 46 |
| 4 | Diskussion | 48 |
| 4.1 | Ausprägung molekularer Sorafenib-Zielstrukturen ausgewählter Lymphomentitäten | 48 |
| 4.2 | Zytostatische Effektivität von Sorafenib gegen humane Lymphome <i>in vitro</i> | 48 |
| 4.3 | Molekulare Wirkung von Sorafenib bei humanen Non-Hodgkin-Lymphomen | 50 |
| 4.4 | Ausblick auf die Möglichkeiten der klinischen Anwendung | 52 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 54 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 55 |

| | | |
|----------|--------------------------------|-----------|
| 7 | Veröffentlichungen..... | 64 |
|----------|--------------------------------|-----------|

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| bidest. | 2-fach destilliert |
| BL | Burkitt-Lymphom |
| BSA | engl.: bovine serum albumin (Rinderserumalbumin) |
| CEM | CCRF-CEM (T-NHL-Zelllinie) |
| CFU | engl.: Colony Formation Unit |
| CHOP | Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin, Prednisolon |
| CML | chronische myeloische Leukämie |
| DLBCL | engl.: diffuse large B-cell lymphoma (diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EC ₅₀ | engl.: half maximal effective concentration (<i>in vitro</i>) |
| ECL | engl.: enhanced chemoluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | engl.: enzyme-linked immuno sorbent assay |
| FACS | engl.: fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie) |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FKS | fötales Kälberserum |
| x g | x-fache Erdbeschleunigung |
| GCP | engl.: good clinical practice |
| HRP | engl.: horseradish peroxidase |
| LDS | Lithiumduodecylsulfat |
| MCL | engl.: mantle cell lymphoma (Mantelzell-Lymphom) |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |

| | |
|--------------|--|
| NHL | Non-Hodgkin-Lymphom |
| PBS | engl.: phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung) |
| PE | Phycoerythrin |
| Pen/Strep | Penicillin-Streptomycin |
| PI | engl.: propidium iodine |
| rpm | engl.: rounds per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 |
| RT | Raumtemperatur |
| T-NHL | T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Triton X-100 | Octylphenolpoly(ethylenglycolether) |
| Tween 20 | Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat |
| WHO | engl.: World Health Organization |
| % (v/v) | engl.: volume/volume (Volumenprozent) |
| % (w/v) | engl.: weight/volume (Gewichtsprozent) |

1 Einleitung

1.1 Aggressive Lymphome

Aggressive Lymphome sind eine Gruppe lymphoider Neoplasien, die unter klinischen Aspekten Gemeinsamkeiten aufweisen. HIDDEMANN ET AL. (1996) teilten die verschiedenen Entitäten der Revised European-American Classification of Lymphoid (REAL) Neoplasms (HARRIS ET AL. 1994) in die Gruppen indolente, aggressive und sehr aggressive Lymphome sowie klassische Hodgkin-Lymphome ein. Aggressive und sehr aggressive Lymphome (vgl. Tabelle 1) haben im Gegensatz zu indolenten Lymphomen einen schnellen klinischen Verlauf mit plötzlichem Symptombeginn und führen unbehandelt innerhalb von Monaten zum Tod. Bei gutem Ansprechen auf die Chemotherapie sind sie aber potentiell heilbar (HIDDEMANN ET AL. 1996).

Tabelle 1: Ausgewählte aggressive und sehr aggressive Lymphome nach HIDDEMANN ET AL. (1996, S. 4088); Nomenklatur entspricht HARRIS ET AL. (1994)

| | B-Zell-Neoplasien | T-Zell-Neoplasien |
|---------------------------------|--|---------------------------------------|
| Aggressive Lymphome | Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom Mantelzell-Lymphom | |
| Sehr aggressive Lymphome | Burkitt-Lymphom | Precursor T-lymphoblastische-Lymphome |

Die World Health Organisation (WHO) nimmt diese klinische Gruppierung allerdings in ihrer aktuellen Klassifikation lymphatischer Neoplasien (SWERDLOW ET AL. 2008) nicht auf, sondern gliedert die diversen Lymphomentitäten vornehmlich nach immunphänotypischen Eigenschaften und morphologischen Ähnlichkeiten der Lymphome mit den physiologischen Reifestadien der lymphatischen Differenzierung. Da beide Einteilungen auf der Nomenklatur der Entitäten nach HARRIS ET AL. (1994) basieren, wird die Einteilung nach HIDDEMANN ET AL. (1996) auch weiterhin weltweit benutzt und stellt eine Brücke dar zwischen der zunehmend spezifischeren Phänotypisierung und der klinischen Handhabbarkeit wissenschaftlicher Erkenntnisse. Dies ist vor allem für die Weiterentwicklung spezieller Therapien einzelner Entitäten von großer Bedeutung.

Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom

Das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) ist mit einem Anteil von 31 % an allen Lymphomen weltweit das häufigste Non-Hodgkin-Lymphom (NHL). Das mediane Patientenalter beträgt 64 Jahre, wobei Männer mit 55% etwas häufiger betroffen sind (ANON. 1997; ARMITAGE und WEISENBURGER 1998). Die aktuelle Therapie basiert auf einer Polychemotherapie (CHOP) mit dem anti-CD20-Antikörper Rituximab (R-CHOP), der die Prognose des DLBCL im Vergleich zur Prä-Rituximab-Ära erheblich verbessert hat (COIFFIER 2007). In Abhängigkeit von diversen Risikofaktoren können mit aktuellen Therapieregimen 4-Jahres-Überlebensraten von 55 % bis 94 % erzielt werden (SEHN ET AL. 2007).

Mantelzell-Lymphom

Das Mantelzell-Lymphom (MCL) weist einen Anteil von 6 % an allen NHL auf, das mediane Patientenalter beträgt 63 Jahre, wobei Männer mit 73 % deutlich häufiger betroffen sind (ANON. 1997). MCL sind genetisch durch die Translokation 4;11 und eine CyclinD1-Überexpression gekennzeichnet (CAMPO ET AL. 1999; BOSCH ET AL. 1994). Eine familiäre Häufung von MCL und von MCL mit anderen B-Zell-Neoplasien ist von TORT ET AL. (2004) beschrieben worden. Bei der aktuellen Therapie stehen Chemotherapieregime wie R-CHOP im Mittelpunkt, doch die Langzeitergebnisse erreichen beim MCL geringere Therapieerfolge als beim DLBCL, weshalb die wissenschaftliche Diskussion und die Ansätze klinischer Studien hier noch wesentlich vielfältiger sind (SALAVERRIA ET AL. 2006). Die mittlere Überlebenszeit konnte zwar in den letzten Jahren verbessert werden, beträgt aber dennoch nur drei bis vier Jahre (CAMPO ET AL. 1999; SWERDLOW und WILLIAMS 2002). Bei jüngeren Patienten konnte aktuell mit aggressiver Chemotherapie bei zusätzlicher Gabe von Rituximab und autologer Stammzelltransplantation ein progressionsfreies Intervall von sechs Jahren bei 66 % der Studienpatienten erzielt werden (GEISLER ET AL. 2008).

Burkitt-Lymphom

Das Burkitt-Lymphom (BL) ist mit einer Prävalenz von < 1 % eine seltene Entität (ANON. 1997), die aber vor allem als endemische Form in Äquatorialafrika, Papua und Neuguinea die häufigste maligne Erkrankung bei Kindern darstellt (BURKITT 1958). Der Altersmedian liegt bei 31 Jahren, wobei männliche Patienten mit 89 % deutlich überrepräsentiert sind (ANON. 1997). Mit intensiver kombinierter Hochdosischemotherapie können bis zu 90 % der Patienten mit niedrigem Krankheitsstadium bei Therapiebeginn geheilt werden (PATTE ET AL. 2007). Patienten mit fortgeschrittenem Stadium können zu 60-80 % geheilt werden (SOUSSAIN ET AL. 1995). Rituximab scheint bei dieser äußerst aggressiv verlaufenden Krankheit sowohl bei jungen als auch bei älteren Patienten hilfreich zu sein (DE VRIES ET AL. 2004; THOMAS ET AL. 2006). Obwohl das BL heilbar ist, sterben vor allem in Afrika immer noch sehr viele Patienten an dieser Krankheit (HARIF ET AL. 2005).

Precursor T-lymphoblastisches Lymphom

Precursor T-lymphoblastische Lymphome (T-NHL) sind mit einer Prävalenz von 1,7 % eine kleine Entität aller NHL, die aber mit einem medianen Patientenalter von 25 Jahren, einem Anteil von 74 % männlichen Patienten und ihrem sehr aggressiven Verlauf doch eine besondere Gruppe darstellt (ANON. 1997; ARMITAGE und WEISENBURGER 1998). Des Weiteren hat diese Patientengruppe ein erhöhtes Risiko für initiales Therapieversagen und frühzeitige Rezidive, häufig auch mit Beteiligung des Zentralen Nervensystems (GOLDBERG ET AL. 2003). Die Therapie erfolgt auch bei den T-NHL in verschiedenen Studien mit CHOP-ähnlichen Chemotherapieprotokollen mit dem Ziel, die fünf-Jahres-Überlebensrate der Patienten von derzeit 26 % zu verbessern (MOREL ET AL. 1992; ANON. 1997).

1.2 Therapeutische Tyrosinkinaseinhibition

Die Aktivierung intrazellulärer Tyrosin-vermittelter Signaltransduktionswege wurde in einer Reihe von Tumorentitäten als kritisch für die Tumorprogression beschrieben (BISHOP 1983; ULLRICH und SCHLESSINGER 1990). Mit molekularer Identifikation der tumorassoziiert aktivierten Tyrosinkinasen wurden dementsprechend Zielstrukturen charakterisiert, deren Inhibition zur Hemmung des Tumorwachstums beitragen kann. So gilt paradigmatisch die therapeutische Tyrosinkinaseinhibition mit Imatinib bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) als die erste zielgerichtete Therapie („targeted therapy“) einer monogenetischen Tumorerkrankung, die zur Standardtherapie geworden ist (DRUKER ET AL. 2006; HEHLMANN ET AL. 2007; KANTARIJAN ET AL. 2007). Das durch die Translokation 9;22 entstehende BCR-ABL-Fusionsgen führt zu einer konstitutiven Überexpression der wachstumsfördernden ABL-Tyrosinkinase und ist somit ursächlich an der Entstehung der chronischen myeloischen Leukämie beteiligt (DEININGER ET AL. 2000). Imatinib verhindert als kompetitiver Inhibitor an der BCR-ABL1-Tyrosinkinase die Phosphorylierung und hemmt somit die unkontrollierte Zellproliferation (DRUKER und LYDON 2000). Die 5-Jahresüberlebensrate liegt mit dieser zielgerichteten Therapie derzeit bei 89 % (DRUKER ET AL. 2006).

Für DLBCL konnte mit der spezifischen Inhibition der Spleen-Tyrosinkinase (SYK) ein ähnlicher Ansatz entwickelt werden, der sich möglicherweise auch auf weitere aggressive Lymphome übertragen lässt, deren Proliferation vom B-Zell-Rezeptor (BCR) abhängig ist (CHEN ET AL. 2008).

Der BCR ist ein Multiprotein, das aus einem extrazellulär membranständigen Immunglobulin (mIgM) und einem nicht-kovalent gebundenen intrazellulären Signaltransduktionselement Ig- α/β besteht (KUROSAKI 1998). Antigenbindung am mIgM führt zur Rezeptoraggregation und nachfolgender Phosphorylierung bestimmter Bindungsstellen an Ig- α/β , wodurch SYK aktiviert und letztlich ebenfalls phosphoryliert wird (vgl. Abbildung 1). Die SYK-Aktivierung funktioniert hierbei als Signalverstärker für die nachfolgenden Signalschritte (GAULD ET AL. 2002). SYK hat eine entscheidende Bedeutung für die B-Zell-Entwicklung, was an Mausmodellen gezeigt werden konnte, bei denen ein SYK-Verlust zur Akkumulation unreifer B-Zell-Vorstufen geführt hatte (CHENG ET AL. 1995). Neben der antigenvermittelten BCR-Aktivierung, die vor allem die Weiterentwicklung zur Plasmazelle und die Produktion von Antikörpern zur Folge hat, findet außer-

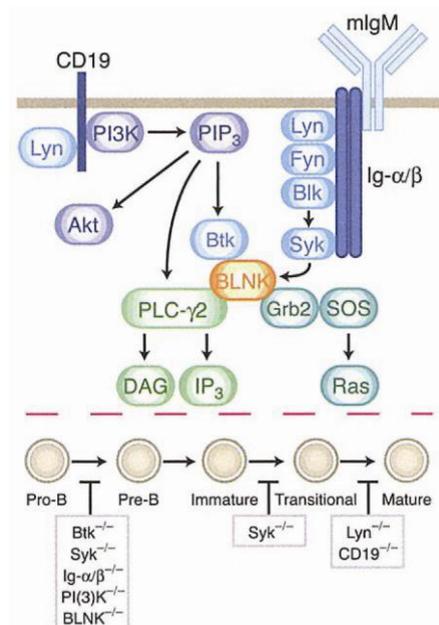


Abbildung 1: BCR-Signalweg und B-Zell-Entwicklung. *Oben:* vereinfachte, antigenvermittelte BCR-Aktivierung; *unten:* Signale, die die B-Zell-Entwicklung beeinflussen. (mod. nach GAULD ET AL. 2002, S. 1641).

dem eine tonische („tonic“) BCR-Aktivierung statt, deren Regulierung zwar noch genauer zu untersuchen bleibt, bei der SYK jedoch nach aktueller Studienlage von zentraler Bedeutung ist (MONROE 2006). CHEN ET AL. (2008) konnten zeigen, dass die spezifische SYK-Inhibition bei mehreren DLBCL mit intaktem BCR-Signalweg zur Apoptoseinduktion führt. Die Tatsache, dass diese Ergebnisse auch ohne antigenvermittelte BCR-Aktivierung erzielt werden konnten, betont die Bedeutung der tonischen Komponente des BCR-Signals für das Überleben und die Differenzierung der B-Zellen.

CHEN ET AL. (2008) verwendeten den ATP-kompetitiven SYK-Inhibitor R406, dessen Wirkung bereits bei anderen immunologisch vermittelten Krankheitsbildern in Phase-II-Studien klinisch erwiesen ist (FRIEDBERG ET AL. 2010).

Die zielgerichtete Tyrosinkinaseinhibition des SYK-vermittelten tonischen BCR-Signals ist ein rationaler und attraktiver Therapieansatz für DLBCL und gegebenenfalls auch für andere B-Zell-Lymphome mit intaktem BCR-Signalweg (CHEN ET AL. 2008; DAVIS ET AL. 2010; Lenz und Staudt 2010).

1.3 Sorafenib

Sorafenib (BAY 43-9006) ist ein oraler Multikinaseinhibitor, der eine wissenschaftlich belegte Wirkung auf verschiedene, vor allem solide, Tumorerkrankungen hat (WILHELM ET AL. 2008). Der zunächst als src-Kinasen-spezifisch verstandenen Substanz konnte im Laufe der Zeit zunehmend multikinaseinhibitorische Wirkung nachgewiesen werden, wodurch auch das Spektrum der therapeutischen Anwendbarkeit erweitert werden konnte (WILHELM ET AL. 2006).

KASID ET AL. konnten 1989 zeigen, dass durch Unterbrechung der Expression von *c-raf-1* (C-Raf) die Tumorgenese im Mausmodell moduliert werden kann. C-Raf gehört zur Familie der Raf-Kinasen, die als zentraler Eintrittspunkt in den Signalweg der mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) gelten und ein Signalmodul darstellen, welches die Verbindung zwischen membranständigen Rezeptoren und nukleären Transkriptionsfaktoren bildet (KOLCH ET AL. 2002). Mit ihren protoonkogenen Eigenschaften sind die Raf-Kinasen, die in über 30 % der humanen Tumore übermäßig aktiv sind, zentral wichtige Signalmoleküle (HOSHINO ET AL. 1999).

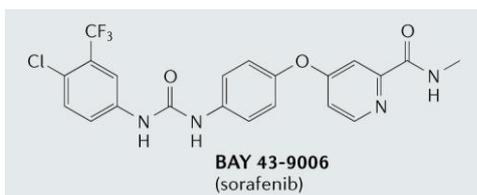


Abbildung 2: Strukturformel von Sorafenib
(WILHELM ET AL. 2006, S. 837)

Sorafenib (vgl. Abbildung 2) ist das Ergebnis eines großangelegten Projektes zur Entwicklung eines spezifischen C-Raf-Inhibitors zur zielgerichteten Tumorthherapie. Hierzu wurden mit speziellen Methoden zwischen 1995 und 1999 über 200.000 chemische Ver-

bindungen auf einen putativen Raf-inhibitorischen Effekt hin untersucht und mit speziellen Syntheseverfahren optimiert (WILHELM ET AL. 2006).

Röntgenkristallographische Untersuchungen des Komplexes aus Sorafenib und den Raf-Kinasen zeigten, dass der distale 4-Pyridyl-Ring die ATP-Bindungstasche der Kinasedomäne belegt, während sich der lipophile Trifluor-methyl-phenyl-Ring am anderen Ende des Moleküls in eine hydrophobe katalytische Schleife einfügt, was beides letztlich zur Inaktivierung der Raf-Kinase führt (WAN ET AL. 2004). Weitere Untersuchungen ergaben, dass Sorafenib außerdem direkt die Autophosphorylierung verschiedener protoonkogener, membranständiger Rezeptortyrosinkinasen in unterschiedlichen humanen Tumorzelllinien blockiert (vgl. Abbildung 3), die für die Tumorentwicklung und die Tumorangiogenese von entscheidender Bedeutung sind (WILHELM ET AL. 2004).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Sorafenib als ein Multikinaseinhibitor über verschiedene Mechanismen die Tumorangiogenese hemmt, Tumorzellapoptose induziert und den MAPK-Signalweg inhibiert, was letztlich das Tumorstadium sowie die Gefäßversorgung des Tumors reduziert und somit antiproliferativ und proapoptotisch wirkt (WILHELM ET AL. 2004).

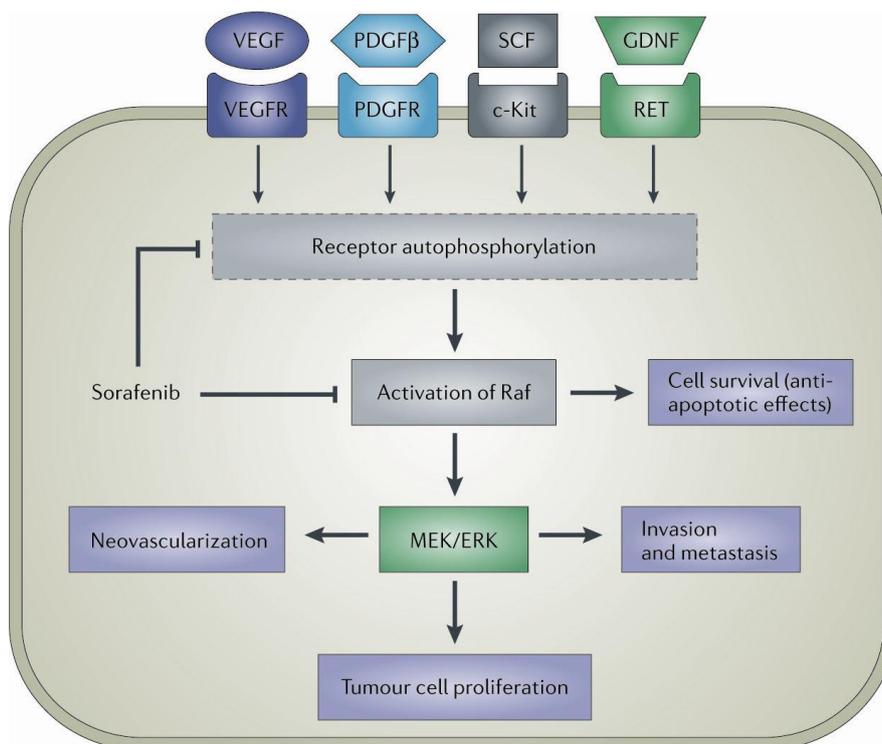


Abbildung 3: Zelluläre Zielstrukturen von Sorafenib.

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor; PDGFR: platelet-derived growth factor receptor; SCF: stem cell factor; GDNF: glial-derived growth factor; MEK: mitogen-activated protein kinase kinase; ERK: extracellular signal-regulated kinase; (WILHELM ET AL. 2006, S. 839)

Phase-I-Studien an Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren zeigten, dass Sorafenib als orale Monotherapie im Allgemeinen gut vertragen wird und zur klinischen Stabilisierung von zuvor progressiven Erkrankungen führt (STRUMBERG ET AL. 2006). Hierbei wurden Plasmaspiegelkonzentrationen von 10,7 bis 15 μM gemessen (STRUMBERG ET AL. 2005). Bei der für Phase-II/III-Studien empfohlenen Sorafenibdosis von 400 mg per os zeigten 15 % der Patienten als Nebenwirkung erythematöse Hautveränderungen mit Schwellungen an Handflächen und Fußsohlen (Hand-Fuß-Syndrom) und 24 % der Patienten gaben Durchfälle während der Therapie an (STRUMBERG ET AL. 2006).

Phase-II/III-Studien wurden zunächst bei Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom durchgeführt, da hier eine Überregulation der Sorafenib-Zielstruktur C-Raf und eine hohe Autophosphorylierungsrate von Rezeptortyrosinkinasen (VEGFR und EGFR) bekannt und mit einer schlechten Prognose verknüpft sind (WILHELM ET AL. 2006). Die Ergebnisse der ersten randomisierten Phase-III-Studie zu Sorafenib an 903 Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom (Treatment Approaches in Renal cancer Global Evaluation Trial, TARGET) zeigten im Vergleich zur Placebogabe ein mit 24 Wochen doppelt so lange progressionsfreies Intervall und bestätigten die Verträglichkeit von Sorafenib mit den Hauptnebenwirkungen wie Durchfall, Hautreaktionen, Schwäche, Hand-Fuß-Syndrom und Bluthochdruck (ESCUDIER ET AL. 2007). Diese Ergebnisse führten in den Vereinigten Staaten von Amerika zur weltweit ersten klinischen Zulassung von Sorafenib für die Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms.

In weiteren präklinischen und klinischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Sorafenib auch bei anderen soliden Tumoren eine wachstumshemmende und apoptoseinduzierende Wirkung hat. Hierzu zählen neben dem Nierenzellkarzinom auch hepatozelluläre Karzinome, Mammakarzinome, Kolonkarzinome, nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, Melanome, Pankreaskarzinome, Schilddrüsenkarzinome und Ovarialkarzinome (WILHELM ET AL. 2008). Bei nicht-soliden Tumoren konnte für die akute myeloische Leukämie (AML) die Wirksamkeit von Sorafenib gezeigt werden (ZHANG ET AL. 2008).

Die Zulassung von Sorafenib zur Tumorthherapie beschränkt sich in Deutschland derzeit auf hepatozelluläre Karzinome und Patienten mit einem Nierenzellkarzinom im fortgeschrittenen Stadium, bei denen eine vorherige Interferon- α - oder Interleukin-2-basierte Therapie erfolglos oder ungeeignet scheint. Die tägliche Dosierungsempfehlung ist zwei Mal 400 mg oral, solange der klinische Nutzen überwiegt.

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Auch wenn der Großteil der Patienten mit aggressiven Lymphomen durch gegenwärtige Formen der Immunpolychemotherapie geheilt werden kann, so ist die Prognose bei Patienten mit primär therapieresistentem oder rezidivierendem aggressiven Lymphom weiterhin infaust (vgl. Kapitel 1.1). Für diese Patienten werden innovative Therapieprinzipien gesucht.

Mit den Versuchen dieser Arbeit sollte präklinisch untersucht werden, inwiefern eine Tyrosinkinaseinhibition mittels Sorafenib zur Therapie von aggressiven Lymphomen geeignet ist. Dazu sollten folgende Fragen experimentell adressiert werden:

- 1) Sind die molekularen Zielstrukturen von Sorafenib in den Entitäten humaner Lymphome ausgeprägt?
- 2) Besitzt Sorafenib eine zytostatische Effektivität gegen humane Lymphome *in vitro*?
- 3) Können aus der molekularen Wirkungsweise von Sorafenib Hypothesen für die Form einer möglichen klinischen Anwendung generiert werden?

2 Material, Methoden und Patientenproben

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| | |
|--|--------------------------------|
| Absaugsystem EcoVac | Schütt Labortechnik, Göttingen |
| Analysewaage | Sartorius, Göttingen |
| Blotmodul XCell II™ CE Mark | Invitrogen, Karlsruhe |
| CASY® DT | Schärfe System, Reutlingen |
| CCD-Kamera FujiFilm LAS-4000mini | FujiFilm, Tokyo (Japan) |
| CO ₂ -Inkubator HERA cell | Heraeus, Osterode |
| Dampfsterilisator Varioklav® | Thermo Scientific, Karlsruhe |
| Eismaschine | ZIEGRA, Isernhagen |
| Elektrophorese-Apparatur XCell Surelock™ | Invitrogen, Karlsruhe |
| ELISA-Reader, Modell 680 | BioRad, München |
| FACSCalibur™ | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Gefrierschränke: | |
| - -80 °C, -150 °C | SANYO, Wiesloch |
| - -20 °C | Liebherr, Biberach |
| Heizblock | Liebisch, Bielefeld |
| Heizofen | Heraeus, Osterode |
| Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCT | Heidolph, Bremen |
| Mikroliterspritze | Hamilton, Schweiz |
| Mikroskope: | |
| - Axiovert 100 | Zeiss, Oberkochen |
| -Labovert FS | Leitz, Oberkochen |
| - Standard 25 | Zeiss, Oberkochen |
| Neubauer-Zählkammer 0,0025 mm ² | Brand Gläser, Wertheim |
| Pipetten: | |
| - Einfach-Pipetten, 10 µl, 200 µl, 1000 µl | Eppendorf, Hamburg |

| | |
|---------------------------------|---|
| - Mehrkanal-Pipette, 50 µl | Thermo Labsystems, Egelsbach |
| - Multipette, Combitips | Eppendorf, Hamburg |
| - Multipette Accu-jet® pro | Brand, Wertheim |
| pH-Meter, pH 211 | HANNA Instruments, Kehl |
| Röntgenfilm-Prozessor SRX-101 A | Konica Minolta, München |
| Röntgenfilm-Kassette | Kodak GmbH, Stuttgart |
| Schüttler Rotamax 120 | Heidolph Instruments, Schwabach |
| Skalpell | Aesculap, Tuttlingen |
| Sterilbank HERA safe | Heraeus, Osterode |
| Trockenschrank | Memmert, Schwabach |
| Vortex-Genie® 2 | Scientific Industries, Bohemia (USA) |
| Wasserbad (250 V; 0,5 AMP-T) | Köttermann, Hännigse |
| Wipptisch, SSL4 (Stuart) | Barloworld Scientific, Staffordshire (GB) |
| Zentrifugen: | |
| - Biofuge pico | Heraeus, Osterode |
| - Multifuge 3, Ausschwingmotor | Heraeus, Osterode |
| - Tischzentrifuge | Eppendorf, Hamburg |

2.1.2 EDV

| | |
|----------------------------------|---|
| Adobe Photoshop 7.0.1 | Adobe Systems, San Jose (USA) |
| Axio Vision 3.1 | Zeiss, Oberkochen |
| Cell Quest Pro 5.2 | Becton Dickinson, Heidelberg |
| FlowJo 5.7.2 | Tree Star Inc., Ashland (USA) |
| GraphPad Prism® 5.03 für Windows | GraphPad Software, San Diego California (USA) |
| ImageJ 1.41 o | W. Rasband, National Institutes of Health (USA) |
| Image Reader LAS 4000 mini V2.0 | FujiFilm, Düsseldorf |
| Microplate Manager 2.6 | BioRad, München |

| | |
|---|---------------------------------------|
| Office XP Version 2002 SP3 | Microsoft, Redmond (USA) |
| WinMDI 2.9 | Joe Trotter, Freeware |
| 2.1.3 Verbrauchsmaterialien | |
| Amersham Hyperfilm™ ECL | Amersham-Buchler, Braunschweig |
| Ampuwa® | Fresenius Kabi, Bad Homburg |
| Deckgläser | Menzel Gläser, Braunschweig |
| Eindrückstopfen | Sarstedt, Braunschweig |
| Einfrierboxen | Nalgene Labware, Rochester (USA) |
| Einmalkanülen: | |
| - BD Microlance 0,45 x 13 mm; 26G1/2 | Becton Dickinson, Heidelberg |
| - mit Lanzettenschliff 2 x 70 mm | Erhardt-Söhne GmbH, Geislingen |
| Einmalspritzen: | |
| - Omnifix® 10 ml / 40 I. U. Insulinspritze | Braun, Melsungen |
| Filtermaterial | PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim |
| Gewebekulturflaschen | Sarstedt, Braunschweig |
| - 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² | |
| Gewebekulturschalen: | |
| - 100 x 20 mm | Sarstedt, Braunschweig |
| - 35 x 10 mm | greiner bio-one, Nürtingen |
| - 15 cm | greiner bio-one, Nürtingen |
| Multiwell-Platten: | |
| - 6-Well-Platte | greiner bio-one, Nürtingen |
| - 96-Well-Platte (Rund- und Flachboden) | Sarstedt, Braunschweig |
| Neubauer-Zählkammer 0,0025 mm ² | Brand GmbH, Wertheim |
| Nitrozellulosemembran, Hybond™, 0,2 µM | Amersham-Buchler, Braunschweig |
| Objektträger, 76 x 26 mm, Mattrand | Knittel Gläser, Braunschweig |
| Parafilm | American National Can™, Chicago (USA) |

Pipetten:

- Pasteurpipetten, 230 mm Brand, Wertheim
- Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml Sarstedt, Braunschweig
- Pipettenspitzen, 10 µl, 200 µl, 1000 µl Sarstedt, Braunschweig

Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml Eppendorf, Hamburg

Röhrchen:

- CASY® Röhrchen 18 ml Sarstedt, Braunschweig
- FACS-Analyse Röhrchen 5 ml Becton Dickinson, Heidelberg
- Kryoröhrchen 1,8 ml Nalgene Labware, Rochester (USA)

Sterilfilter Sarstedt, Braunschweig

Zellsieb 70 µm Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.4 Chemikalien

Bromphenolblau BioRad, München

CellLytic™ M Cell Lysis Reagent Sigma, Deisenhofen

Dimethylsulfoxid (DMSO) Merck, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat Merck, Darmstadt

Dithiothreitol (DTT, 0,1 M) Invitrogen, Karlsruhe

Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Sigma, Deisenhofen

FACSFlow™ Becton Dickinson, Heidelberg

Fötale Kälberserum (FKS) Biochrom AG, Berlin

Hepes Sigma, Deisenhofen

IMDM Invitrogen, Karlsruhe

Isopropanol J. T. Baker, Griesheim

Kaliumchlorid Merck, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat Merck, Darmstadt

Magermilchpulver BioRad, München

Methanol J. T. Baker, Griesheim

| | |
|---|--|
| Natriumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Natriumfluorid | Merck, Darmstadt |
| Natriummolybdat | Sigma, Deisenhofen |
| Natriumorthovanadat | Sigma, Deisenhofen |
| NuPAGE® Antioxidant | Invitrogen, Karlsruhe |
| NuPAGE® LDS Sample Buffer (4 x) | Invitrogen, Karlsruhe |
| NuPAGE® SDS Running Buffer (20 x) | Invitrogen, Karlsruhe |
| NuPAGE® Transferbuffer (20 x) | Invitrogen, Karlsruhe |
| NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel | Invitrogen, Karlsruhe |
| Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) | Invitrogen, Karlsruhe |
| Phosphate Buffered Saline (PBS) | Sigma, Deisenhofen |
| Propidium Iodid (PI) | Sigma, Deisenhofen |
| Röntgenentwickler Visopan Multiplex | Fischer-Sehner Medical Imaging, Berlin |
| Röntgenfixierer Visopan Multiplex | Fischer-Sehner Medical Imaging, Berlin |
| Thiazolyl Blue Tetrazolin Bromid (98 %) | Sigma, Deisenhofen |
| Triton X-100 | Sigma, Deisenhofen |
| Trypan-Blau (0,4 %) | Sigma, Deisenhofen |
| Trypsin/EDTA 0,05 % | Invitrogen, Karlsruhe |
| Tween 20, Sigma Ultra | Sigma, Deisenhofen |

2.1.5 Kits

| | |
|--|--------------------------------|
| DC Protein Assay | BioRad, München |
| ECL™ Western Blotting Detection Reagents | Amersham-Buchler, Braunschweig |
| Human Phospho-Kinase Antibody Array | R&D Systems, Minneapolis (USA) |
| Raf Family Antibody Sampler Kit #2330 | Cell Signaling, Danvers (USA) |

2.1.6 Proteine, Proteinaseinhibitoren und Proteinstandards

| | |
|--|------------------------------------|
| Annexin-V-FLUOS (# 11 828 681 001) | Roche Diagnostic GmbH, Mannheim |
| Proteinaseinhibitorcocktail | Sigma, Deisenhofen |
| Proteinstandard (prestained), Precision Plus (# 161-0373) | BioRad, München |
| Rinderserumalbumin (BSA, 100 x) | New England Biolabs, Ipswich (USA) |

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primärantikörper

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

| Antigen | Spezies | Verdünnung | | Katalogname | Herkunft / Referenz |
|---------------------------------|-----------|--------------|------|-------------|--------------------------------|
| | | Western-Blot | FACS | | |
| Aktin | Maus | 1:2000 | | A 3853 | Sigma, Saint Louis (USA) |
| AKT | Kaninchen | 1:1000 | | 9272 | Cell Signaling, Danvers (USA) |
| P-AKT | Kaninchen | 1:1000 | | 9271 | Cell Signaling, Danvers (USA) |
| c-kit | Maus | | 1:50 | IM2732 | Beckman Coulter, Krefeld |
| CyclinD1 | Maus | 1:1000 | | sc-70900 | Santa Cruz, Santa Cruz (USA) |
| ERK | Kaninchen | 1:1000 | | sc-93 | Santa Cruz, Santa Cruz (USA) |
| P-ERK | Maus | 1:1000 | | sc-81492 | Santa Cruz, Santa Cruz (USA) |
| FIt3 | Maus | | 1:50 | IM2234U | Immunotech, Marseille (F) |
| P38 | Kaninchen | 1:3000 | | M 0800 | Sigma, Saint Louis (USA) |
| P-P38 | Kaninchen | 1:1000 | | P 1491 | Sigma, Saint Louis (USA) |
| PDGFRα | Kaninchen | | 1:50 | RB-9027 | Thermo Scientific, Karlsruhe |
| A-Raf | Kaninchen | 1:1000 | | 4432 | Cell Signaling, Danvers (USA) |
| P-A-Raf | Kaninchen | 1:1000 | | 4431 | Cell Signaling, Danvers (USA) |
| B-Raf | Maus | 1:1000 | | 9434 | Cell Signaling, Danvers (USA) |
| P-B-Raf | Kaninchen | 1:1000 | | 2696 | Cell Signaling, Danvers (USA) |
| C-Raf | Kaninchen | 1:1000 | | 9422 | Cell Signaling, Danvers (USA) |
| P-C-Raf | Kaninchen | 1:1000 | | 9421 | Cell Signaling, Danvers (USA) |
| VEGF-R1 | Maus | | 1:50 | FAB321 P | R&D Systems, Minneapolis (USA) |
| VEGF-R2 | Maus | | 1:50 | FAB357 P | R&D Systems, Minneapolis (USA) |

2.1.7.2 Sekundärantikörper

Folgende Sekundärantikörper wurden im Western-Blot 1:2000 in TBS-Tween verdünnt eingesetzt:

| | |
|-----------------------------------|------------------------------|
| Ziege anti-Maus, HRP-Konjugat | Santa Cruz, Santa Cruz (USA) |
| Esel anti-Kaninchen, HRP-Konjugat | Santa Cruz, Santa Cruz (USA) |

Folgender Sekundärantikörper wurde in der Durchflusszytometrie 1:50 in PBS verdünnt eingesetzt:

Esel anti-Kaninchen, FITC-Konjugat Jackson ImmunoResearch, West Grove (USA)

2.1.8 Versuchssubstanz Sorafenib

Tabelle 3: Sorafenib

| Substanz | Stocklösung | Herkunft |
|---|-------------------|---|
| Sorafenibtosylat (637 g/mol) | 14,6 mM (in DMSO) | Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Montville (USA) |

2.1.9 Medien für die Zellkultur

Für die Kultur der Zelllinien wurde RPMI 1640 mit 25 mM Hepes und GlutaMAX als Grundmedium verwendet, welches mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertem FKS supplementiert wurde.

Die Hitzeinaktivierung des FKS erfolgte zuvor im Wasserbad bei 56 °C für 30 min und anschließender Sterilfiltration.

2.1.10 Zelllinien

Tabelle 4: Verwendete humane Zelllinien

| Zelllinie | Entität | Herkunft | Referenz |
|-------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| Balm3 | DLBCL | B. Glass | LOK ET AL. 1979 |
| CCRF-CEM | T-NHL | DSMZ, Braunschweig | FOLEY ET AL. 1965 |
| Granta 519 | MCL | DSMZ, Braunschweig | JADAYEL ET AL. 1997 |
| Jeko | MCL | ATCC, Wesel | JEON ET AL. 1998 |
| Jurkat | T-NHL | DSMZ, Braunschweig | SCHNEIDER ET AL. 1977 |
| Karpas 422 | DLBCL | DSMZ, Braunschweig | DYER ET AL. 1990 |
| MDA-MB-231 | Brustdrüsenkarzinom | ATCC, Wesel | CAILLEAU ET AL. 1974 |
| Mino | MCL | ATCC, Wesel | LAI ET AL. 2002 |
| Molt-4 | T-NHL | DSMZ, Braunschweig | MINOWADA ET AL. 1972 |
| Raji | Burkitt-Lymphom | DSMZ, Braunschweig | PULVERTAFT 1964 |
| Ramos | Burkitt-Lymphom | DSMZ, Braunschweig | KLEIN ET AL. 1975 |
| SU-DHL-4 | DLBCL | DSMZ, Braunschweig | EPSTEIN ET AL. 1976 |

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellzahlbestimmung mit Neubauer-Zählkammer

Zur Zellzahlbestimmung mit einer Neubauer-Zählkammer wurde aus einem Aliquot der Zellsuspension eine Verdünnung von 1:5 bis 1:20 mit Trypan-Blau hergestellt. Trypan-Blau ermöglicht es, vitale von letalen Zellen zu unterscheiden, da es die Membranen letaler Zellen blau färbt. Zur Ermittlung der vitalen Zellen wurden die ungefärbten Zellen in vier Großquadranten einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Aus dieser Zahl wurde nach folgender Formel die Zellzahl berechnet:

Zellzahl [ml^{-1}] = (Mittelwert der vier Großquadranten) $\times 10^4 \times$ Verdünnungsfaktor \times Ausgangsvolumen

2.2.2 Zellzahlbestimmung mit CASY

| | |
|-------------|---------------------------------|
| CASY-Puffer | 135 mM NaCl |
| | 1 mM EDTA |
| | 5 mM KCl |
| | 45 mM KH_2PO_4 |
| | 11 mM Na_2HPO_4 |
| | 7 mM NaF |

Zur Zellzahlbestimmung mit CASY® DT wurde aus einem Aliquot der Zellsuspension eine Verdünnung von 1:1000 mit CASY-Puffer hergestellt. CASY® DT ermittelt Anzahl und Größe von korpuskularen Messereignissen mehrerer Stichproben dieser Verdünnung und bestimmt anhand von Eichkurven die Zellkonzentration der Zellsuspension. Diese Konzentration wurde mit dem Ausgangsvolumen multipliziert, um die gesuchte Zellzahl zu erhalten.

Die Eichkurven wurden zuvor für jede Zelllinie, der Bedienungsanleitung folgend, erstellt (Innovatis AG, Reutlingen April 2002; Version 2.3D).

2.2.3 Kultivieren von Zellen

Alle Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre und 5 % CO_2 bei 37 °C kultiviert und jeden zweiten Tag mit frischem, vorgewärmtem Medium versorgt. Die Zellen wurden zwei Mal pro Woche in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 ausgedünnt. Bei adhärennten Zelllinien wurde zunächst sämtliches Medium abgesaugt, die Kulturflasche vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend vorgewärmtes Trypsin-EDTA hineingegeben. Unter gleichmäßigem Schwenken der Kulturflasche wurden die Zellen vereinzelt und konnten dann ausgedünnt werden. Die nachfolgende Zugabe von frischem Kulturmedium stoppte die Trypsinreaktion.

2.2.4 Kryokonservierung von Zellen

| | |
|----------------|-----------|
| Einfriermedium | 90 % FKS |
| | 10 % DMSO |

Zur Kryokonservierung wurde, nach vorheriger Konzentrationsbestimmung, die Zellsuspension in der Zentrifuge mit 1200 rpm für 5 min bei RT pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Das Volumen hierfür wurde so gewählt, dass eine Zellkonzentration von 5×10^6 /ml entstand. In zuvor beschriftete Kryoröhrchen wurde je 1 ml dieser Zellsuspension überführt und in einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox zunächst über Nacht bei -80°C eingefroren und anschließend bei -150°C gelagert.

2.2.5 Revitalisieren von Zellen

Zum Revitalisieren von Zellen wurde das entsprechende Kryoröhrchen kurz im Wasserbad bei 37°C angetaut. Die Zellsuspension wurde dann in ein Plastikröhrchen mit 12 ml PBS überführt und in der Zentrifuge mit 1200 rpm für 5 min bei RT pelletiert. Dieser Waschschrift diente dem Entfernen von DMSO. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm^2 große Zellkulturflasche überführt.

2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, simultan Größe, Granularität sowie unterschiedliche Fluoreszenzsignale zu quantifizieren. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Expression membranständiger Rezeptoren untersucht. Hierzu wurden je 1×10^5 Zellen einer Zelllinie in FACS-Röhrchen überführt und nach fünfminütiger Zentrifugation einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die gewaschenen Pellets in je $100\ \mu\text{l}$ PBS resuspendiert und entweder der Primärantikörper oder eine Isotypkontrolle mit einer Verdünnung von 1:50 dazu pipettiert. Hiernach wurde die Zellsuspension im Dunkeln für 30 min bei RT inkubiert. Primärantikörper mit direkt konjugierten Fluorochromen wurden nach der Färbung einmal mit PBS gewaschen und konnten dann direkt im FACS gemessen werden. Der unkonjugierte PDGFR α -Primärantikörper wurde nach dem Waschschrift in PBS mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper detektiert, dann erneut einmal mit PBS gewaschen und anschließend im FACS gemessen.

Die FITC-Signale wurden im grünen Wellenlängenbereich und die PE-Signale im roten Wellenlängenbereich auf einem FACSCalibur gemessen, mit CellQuest detektiert und mit FlowJo analysiert.

2.2.7 Zytotoxizitäts-Assays

2.2.7.1 MTT-Test

| | |
|---------------|---|
| MTT-Reagenz 1 | 0,05 g MTT ad 10 ml PBS |
| MTT-Reagenz 2 | 33 % (v/v) DMSO 5 % (v/v) Ameisensäure 62 % (v/v) Isopropanol |

Mit dem MTT-Test wurde die zytotoxische Wirkung ansteigender Konzentrationen des Multikinaseinhibitors Sorafenib untersucht. Als Kontrollen dienten Medium sowie eine DMSO-Konzentrationsreihe, die den Sorafenib-Konzentrationen entsprechende Mengen DMSO enthielt. Die verwendeten doppelt konzentrierten Arbeitslösungen wurden für die verschiedenen Konzentrationen wie folgt hergestellt (Tabelle 5):

Tabelle 5: Verdünnungsreihe für MTT-Test. * Stocklösung bedeutet Stocklösung Sorafenib oder entsprechend DMSO

| Kürzel | Zielkonzentration | Arbeitslösung | Ansatz |
|--------|-------------------|---------------|---|
| A | 14,6 μ M | 29,2 μ M | 10 μ l Stocklösung* + 4,990 ml Medium |
| B | 7,30 μ M | 14,6 μ M | 2,5 ml A + 2,5 ml Medium |
| C | 3,65 μ M | 7,30 μ M | 2,5 ml B + 2,5 ml Medium |
| D | 1,83 μ M | 3,65 μ M | 2,5 ml C + 2,5 ml Medium |
| E | 0,73 μ M | 1,46 μ M | 2,0 ml D + 3,0 ml Medium |
| F | 0,37 μ M | 0,73 μ M | 2,5 ml E + 2,5 ml Medium |
| G | 0,00 μ M | 0,00 μ M | 5 ml Medium |

Die in dem MTT-Reagenz 1 enthaltenen Tertrazoliumringe werden durch Dehydrogenasen der Zellen gespalten, wodurch violettes Formazan entsteht (DENIZOT und LANG 1986). Durch die Zugabe des MTT-Reagenz 2 wird dieses gelöst. Abschließend wird die Absorption des umgesetzten Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 540 nm und einem Referenzfilter von 655 nm mit dem ELISA-Reader bestimmt.

Der MTT-Test wurde für die Suspensionszelllinien auf 96-Well-Rundbodenplatten durchgeführt. In jedes Well wurden 100 μ l mit je 1×10^5 Zellen sowie 100 μ l der vorbereiteten doppelt konzentrierten Arbeitslösung gegeben. Dabei wurde jede Probe als Triplikat angesetzt. Nach einer 24-stündigen Inkubation, wurden jeder Probe 10 μ l MTT-Reagenz 1 zugegeben und der Ansatz wurde für weitere 4 h unter den gewöhnlichen Zellkulturbedingungen inkubiert. Nachfolgend wurden bei Suspensionszelllinien die Zellen mit 1200 rpm für 15 min in der Multifuge 3 bei RT pelletiert, der Überstand mit der Mehrkanalpipette vorsichtig abgenommen und anschließend 100 μ l MTT-Reagenz 2 hinzugegeben. Bis zum Erreichen einer homogenen Lösung in den Wells, wurden die 96-Well-Platten auf dem Wipptisch geschwenkt.

Zur Auswertung wurde nach Leerwertbereinigung die spezifische Viabilität als Quotient aus dem mittleren Absorptionwert der behandelten Proben und dem mittleren Absorptions-

wert der unbehandelten Proben gebildet. Die EC_{50} stellt die mittlere effektive Dosis einer Substanz dar und wurde mit Hilfe der *curve fitting function (sigmoidal dose-response, variable slope)* der Software GraphPad Prism® für Windows, Version 5.03 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) bestimmt.

2.2.7.2 Annexin-V-Fluos / PI-Färbung

| | |
|-----------------------------|---|
| Hepes-Puffer | 10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4 140 mM NaCl 5 mM CaCl ₂ |
| Annexin-V-Fluos-Färbelösung | 30 µl Annexin-V-Fluos + 1470 µl Hepes-Puffer |
| PI-Stammlösung | 50 µg / ml RPMI |

Tabelle 6: Pipettierschema für Sorafenibinkubationen

| | Zielkonzentration Sorafenib | Pipettierschema |
|--------------------------|-----------------------------|---|
| Vorverdünnung | 1,46 mM | 20 µl Stocklösung Sorafenib + 180 µl Medium |
| Inkubationsansatz | 14,6 µM | 20 µl Vorverdünnung in 2 ml Zellansatz |
| | 7,30 µM | 10 µl Vorverdünnung in 2 ml Zellansatz |
| | 3,65 µM | 5 µl Vorverdünnung in 2 ml Zellansatz |
| | 1,83 µM | 2,5 µl Vorverdünnung in 2 ml Zellansatz |
| | 0,00 µM | 20 µl DMSO in 2 ml Zellansatz |

Annexin-V-Fluos hat eine starke Affinität zu Phosphatidylserin, welches in der Frühphase der Apoptose von der inneren noch intakten Doppelmembranschicht eukaryotischer Zellen in die äußere Schicht wechselt (VERMES ET AL. 1995). Mit Hilfe der im FACS detektierbaren Annexin-V-Fluos / PI-Doppelfärbung konnte der Anteil von viablen, früh- und spätaoptotischen Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Sorafenibinkubation bestimmt werden. Hierzu wurden 1×10^5 Zellen in je 2 ml Kulturmedium als Triplikat für Konzentrationen von 0 µM Sorafenib bis 14,6 µM Sorafenib auf 6-Well-Platten ausgesät. Nachfolgend wurden gemäß Tabelle 6 entsprechende Mengen einer Vorverdünnung der Sorafenib Stocklösung hinzugegeben. Nach jeweils 24 h Inkubation unter Standardbedingungen wurden aus jedem Well 500 µl Zellsuspension in zuvor beschriftete FACS-Röhrchen überführt und zweimal mit 1200 rpm für 5 min bei RT pelletiert und in PBS resuspendiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 100 µl Annexin-V-Fluos-Färbelösung resuspendiert und nach der anschließenden Zugabe von 100 µl PI-Stammlösung für 10 min im Dunkeln inkubiert.

Die Annexin-V-Fluos-Signale wurden im grünen Wellenlängenbereich und die PE-Signale im roten Wellenlängenbereich auf einem FACSCalibur gemessen, mit CellQuest detektiert und mit WinMDI analysiert.

2.2.7.3 Langzeitkulturen

Mit Hilfe von Langzeitkulturen wurde die zytotoxische Wirkung von Sorafenib bei Langzeitexposition untersucht. Hierzu wurden 2×10^5 Zellen in 2 ml Zellkulturmedium in 25 cm² Zellkulturflaschen mit verschiedenen Sorafenibkonzentrationen gemäß Tabelle 6 als Triplikat unter Standardbedingungen inkubiert. Jeden zweiten Tag wurde die Zellzahl mit CASY® DT bestimmt (vgl. Kapitel 2.2.2) und frisches Medium mit entsprechender Sorafenibkonzentration hinzugegeben (vgl. Tabelle 6). Nach zehn Tagen wurde zusätzlich eine Annexin V / PI-Färbung gemäß Kapitel 2.2.7.2 durchgeführt. Zur Testung der Klonogenität der alternden Zellen in der Sorafenibgruppe wurde zudem die Colony Formation Unit (CFU) gemäß nachfolgendem Kapitel 2.2.8 ohne Sorafenib angefertigt.

2.2.8 Klonogenitätstest - Colony Formation Unit (CFU)

| | |
|-----------------------|---------------------------------|
| Methylzelluloseansatz | Methylzellulose Methocult™H4230 |
| | 10 % (v/v) IMDM |

Nach dem Waschen der Zellen aus den Langzeitkulturen (vgl. Kapitel 2.2.7.3) mit PBS wurden je 1×10^3 Zellen mit 1200 rpm für 5 min bei RT pelletiert, in 100 µl Zellkulturmedium aufgenommen und mit 1 ml Methylzelluloseansatz versetzt in Gewebekulturschalen (35 x 10 mm) überführt. Es folgte eine erneute Inkubation unter Standardbedingungen im Inkubator, wobei eine weitere Gewebekulturschale mit sterilem Wasser in unmittelbarer Nähe zu den Versuchsansätzen eine wassergesättigte Atmosphäre sicherstellte. Nach zehn Tagen wurden die Anzahl der entstandenen Kolonien mit Hilfe eines Mikroskops bestimmt und repräsentative Kolonien mit einem inversen Mikroskop und dem Programm Axio Vision dokumentiert.

2.2.9 Zellzyklusanalyse

| | |
|----------------|---------------------------|
| Analyse-Puffer | 0,1 % (w/v) Natriumcitrat |
| | 0,1 % (v/v) Triton X-100 |
| | 50 µg/ml PI |

Mit der Zellzyklusanalyse wurde die Wirkung von unterschiedlichen Sorafenibkonzentrationen auf den Zellzyklus nach 24 h und 48 h untersucht. Hierzu wurde ein hypotoner, tritonhaltiger Analyse-Puffer verwendet, der die Zell- und Kernmembranen aufbricht und mit dem ebenfalls enthaltenen PI die DNA der Zellen anfärbt (NICOLETTI ET AL. 1991). Die Menge an PI in der Zelle korreliert mit ihrem DNA-Gehalt und lässt somit Rückschlüsse auf den Zellzyklus zu, der sich bei viabler Zellsuspension in einem meist zweigipfligen Histogramm darstellt und dessen beide Hochpunkte die G1- und G2-Phase markieren. Zwischen den Hochpunkten liegen die Zellen der S-Phase (FRIED ET AL. 1978).

Es wurden je 1×10^5 Zellen in 2 ml Kulturmedium auf 6-Well-Platten ausgesät und mit unterschiedlichen Sorafenibkonzentrationen entsprechend Tabelle 6 als Triplikat inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 500 μ l in zuvor beschriftete FACS-Röhrchen überführt, in PBS gewaschen und mit 800 rpm für 5 min bei 4 °C pelletiert. Die Zellen wurden in 500 μ l Analyse-Puffer aufgenommen und für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Die PI-Signale wurden im roten Wellenlängenbereich auf einem FACSCalibur gemessen und mit CellQuest detektiert. Die Zellzyklusphasen der Proben wurden mit der automatischen Zellzyklusanalysefunktion von FlowJo auf Grundlage der Methode von Watson (Pragmatic) berechnet (WATSON ET AL. 1987).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung der Western-Blot-Lysate

| | |
|----------------|---|
| Lysis-Cocktail | 1 mM Na_3VO_4 |
| | 10 mM Na_2MoO_4 |
| | 1 % (v/v) Proteininaseinhibitorcocktail |
| | ad 2 ml CellLytic™ M |

Zur Herstellung der Zelllysate für Western-Blot wurden jeweils 1×10^7 Zellen mit 1200 rpm für 10 min bei RT pelletiert und in 6 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. War eine Inkubation mit Sorafenib vorgesehen, so wurden diese 6 ml Zellsuspension in 2 ml Fraktionen auf 6-Well-Platten ausgesät, für 2 h mit Sorafenibkonzentrationen von 0 μ M bis 14,6 μ M (vgl. Tabelle 6) im Brutschrank inkubiert und anschließend wieder zu 6 ml Zellsuspension zusammengeführt. War keine Inkubation mit Sorafenib vorgesehen, so konnte dieser Schritt übersprungen werden. Die Zellen wurden hiernach mit 1200 rpm für 10 min bei RT pelletiert, in 125 μ l Lysis-Cocktail aufgenommen und in vorbereitete 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, die umgehend auf Eis gestellt wurden. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 min bei 4 °C auf dem Schüttler und anschließender Zentrifugation mit 13.000 rpm für 25 min bei ebenfalls 4 °C. Der Überstand wurde in neue, vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert oder auf Eis gekühlt direkt weiterverwendet.

2.3.2 Proteinbestimmung nach BioRad DC Protein Assay

(LOWRY ET AL. 1951; PETERSON 1979)

| | |
|------------|------------------------------------|
| Reagenz A | alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung |
| Reagenz B | verdünntes Folin-Reagenz |
| Reagenz S | Natriumdodecylsulfat |
| Reagenz A' | 20 µl Reagenz S + 980 µl Reagenz A |

Der Proteingehalt der Lysate wurde mit dem DC Protein Assay der Firma BioRad bestimmt. Hierzu wurden auf einer unbeschichteten 96-Well-Platte sowohl eine Eichgerade als auch die zu bestimmenden Lysate als Duplikate aufgetragen. Zunächst wurde eine BSA-Lösung von 2 mg/ml mit Aqua bidest. hergestellt, aus der dann gemäß Tabelle 7 die Eichgerade pipettiert wurde.

Tabelle 7: Pipettierschema für die Eichgerade zur Proteinbestimmung

| Eichgerade [mg/ml] | 0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 |
|-----------------------|---|-----|-----|-----|-----|
| H ₂ O [µl] | 5 | 4,5 | 4 | 3 | 1 |
| BSA-Lsg. [µl] | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 4 |

Für die Lysate wurden jeweils 1 µl Lysat zusammen mit 4 µl Aqua bidest. aufgetragen, was einer Verdünnung um den Faktor 5 entsprach. Nach der Zugabe von 25 µl Reagenz A' und 200 µl Reagenz B in jedes verwendete Well wurden die Proben für 15 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge 750 nm im ELISA-Reader bestimmt. Anhand der Eichgerade und der gemessenen Absorption der Proben konnte die jeweilige Proteinkonzentration berechnet werden (DC Protein Assay Manual LIT448, BioRad 1997).

2.3.3 LDS-Gelelektrophorese

| | |
|------------------------------|--|
| Laufpuffer (4 °C) | 50 ml NuPAGE® LDS Running Buffer (20 x) 950 ml Aqua bidest. |
| Probenpuffer | NuPAGE® LDS Sample Buffer (4 x) |
| Reduktionsmittel | 0,1 M DTT |
| Proteinstandard (prestained) | Precision Plus (# 161-0373), BioRad, München |
| Antioxidans | NuPAGE® Antioxidant |

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurden vorgekühlte 4 – 12 % Bis-Tris-LDS-Gele verwendet. Die Lysate wurden auf Eis aufgetaut und die benötigte Menge Protein in neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen überführt. Es wurde für jede geplante Spur einer Probe eine Proteinmenge von 25 µg, 5 µl Probenpuffer, 1 µl 0,1 M DTT sowie Aqua bidest. ad 20 µl Gesamtvolumen vorbereitet. Diese Ansätze wurden mit dem Vortexer gemischt, mit 13.000 rpm für 1 min bei RT zentrifugiert und im Heizblock für 10 min bei 70 °C denaturiert. Währenddessen wurde die Elektrophorese-Apparatur nach Herstellerangaben (NuPAGE® Technical Guide Version E, Invitrogen, 10/2003) mit zwei Gelen zusammengesetzt und mit Laufpuffer gefüllt. Nach erneuter Zentrifugation der Ansätze mit 13.000 rpm für 1 min bei RT wurden die Gele mit Hilfe einer Mikroliterspritze beladen. In jedem Gel wurde mindestens eine Tasche mit 6 µl Proteinstandard beladen. In die zwischen den beiden Gelen befindliche Kammer wurde abschließend 500 µl Antioxidans gegeben. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst bei 80 V für 5 min und anschließenden bei 185 V für 1 h.

2.3.4 Nassblot auf Nitrozellulosemembranen

| | |
|-----------------------|---|
| Transferpuffer (4 °C) | 50 ml NuPAGE® Transfer Buffer 200 ml Methanol 750 ml Aqua bidest. |
|-----------------------|---|

Die der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden mit einem Nassblot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen („Transfer“) (TOWBIN ET AL. 1979). Hierzu wurden für jedes Gel eine Nitrozellulosemembran sowie zwei Whatman-Filterpapiere zugeschnitten und zusammen mit mehreren Blot-Schwämmen („Blotting Pads“) in Transferpuffer äquilibriert. Die Gele wurden nach der Elektrophorese aus ihren Plastikhüllen entfernt und zusammen mit den äquilibrierten Bestandteilen im Blotmodul nach Herstellerangaben luftblasenfrei geschichtet (NuPAGE® Technical Guide Version E, Invitrogen, 10/2003). Das mit Transferpuffer gefüllte Blotmodul wurde in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und mit vorgekühltem deionisiertem Wasser umgeben. Zusätzlich wurde die gesamte Apparatur in ein Eisbad gestellt, um eine zu hohe Temperaturentwicklung zu vermeiden. Der Transfer erfolgte bei 30 V für 70 min.

2.3.5 Immundetektion

| | |
|------------|--|
| TBS (10 x) | 24,2 g Tris 80 g NaCl ad 1 l Aqua bidest.; pH 7,6 (HCl) |
| TBS-Tween | 100 ml TBS (10 x) 1 ml Tween 20 900 ml Aqua bidest. |
| Blotto | 5 g Magermilchpulver 100 ml TBS-Tween |
| ECL-System | 5 ml Reagenz A (Chemolumineszenzkit, Amersham-Buchler) 5 ml Reagenz B (Chemolumineszenzkit, Amersham-Buchler) |

Zur Detektion der Proteine auf der Nitrozellulosemembran wurde die Membran nach dem Transfer kurz in TBS-Tween gewaschen, um Rückstände von Methanol zu entfernen, und anschließend auf dem Wipptisch für 2 h bei RT mit Blotto geblockt. Generell wurden alle nachfolgenden Waschschrte in diesem Versuch auf dem Wipptisch bei RT in Plastikschaen durchgeföhrt. Nach 3 x 10 min Waschen mit TBS-Tween wurde die Membran über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler mit in TBS-Tween verdünntem Primärantikörper (vgl. Kapitel 2.1.7.1) inkubiert. Hierbei wurde die Plastikscha luftdicht verschlossen, um ein Austrocknen der Membran zu verhindern. Am Folgetag wurde die Membran erneut für 3 x 10 min in TBS-Tween gewaschen, um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Die Sekundärantikörperinkubation mit ebenfalls in TBS-Tween gelöstem, HRP-konjugiertem Antikörper (vgl. Kapitel 2.1.7.2) erfolgte auf dem Wipptisch für 1 h bei RT. Ungebundener Sekundärantikörper wurde mit drei Waschschrten à 10 min in TBS-Tween entfernt. Für die Detektion des Chemolumineszenzsignals wurde die Membran zunächst für 1 min in dem ECL-System inkubiert und anschließend in transparente Plastikfolie gelegt.

Die Dokumentation des Signals erfolgte sowohl mittels spezieller Röntgenfilme und einer Röntgenfilm-Kassette als auch digital mit einer CCD-Kamera und dem Programm Image Reader LAS 4000 bei Belichtungszeiten von 1 sek bis ggf. 25 min.

2.3.6 Kinase Screen Array mit R&D Proteom Profiler™ Array

(R&D Systems Inc., Product Insert ARY003, 05/2008)

| | |
|------------------------|---|
| Waschpuffer | 40 ml 25 x Wash Buffer Conc. (Bestandteil des Kits) ad 960 ml Aqua bidest. |
| Detektionsantikörper A | Detection Antibody Cocktail A (Bestandteil des Kits) |
| Detektionsantikörper B | Detection Antibody Cocktail B (Bestandteil des Kits) |
| Streptavidin-HRP | Streptavidin-HRP (Bestandteil des Kits) |

Der Kinase Screen Array wurde nach Vorschrift des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Materialien und Reagenzien durchgeführt. Auf den zwei zusammengehörenden Nitrozellulosemembranen A und B befanden sich insgesamt 45 verschiedene Antikörperduplikate sowie mehrere Kontrollen. Die Lysate für diesen Array wurden nach zweistündiger Inkubation mit 0 μ M und 7,3 μ M Sorafenib gemäß Tabelle 6 (s. a. Kapitel 2.3.1) entsprechend den Herstellerangaben hergestellt und ihr Proteingehalt wurde wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben bestimmt. Die Nitrozellulosemembranen wurden anschließend über Nacht mit diesen Proteinlysaten bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Für die Nitrozellulosemembran A und B wurden zusammen 300 μ g Proteinlysat eingesetzt. Am Folgetag wurden die Membranen dreimal für 10 min im mitgelieferten Waschpuffer auf dem Wipptisch bei RT gewaschen. Alle weiteren Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten ebenfalls bei RT auf dem Wipptisch. Membran A wurde nachfolgend mit dem Detektionsantikörper A für 2 h inkubiert. Membran B wurde entsprechend mit dem Detektionsantikörper B inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten à 10 min wurden die Membranen A und B für 30 min mit verdünntem Streptavidin-HRP inkubiert. Ungebundenes Streptavidin-HRP wurde mit drei abschließenden Waschschritten à 10 min entfernt. Die Membranen wurden - wie in Kapitel 2.3.5 erläutert - mit einem ECL-System behandelt und mit Röntgenfilmen detektiert. Die Signalintensität eines jeden Punktes entsprach dem Phosphorylierungsgrad des jeweils gebundenen Proteins.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Programm ImageJ zur Quantifizierung der Signale und Excel zur Darstellung als Balkendiagramm.

2.4 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism® 5.03 für Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) durchgeführt. Unterschiede von $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

2.4.1 Two-way ANOVA mit Bonferroni-Posttest

Die Two-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Posttest testet den Einfluss zweier variabler Faktoren auf die Messwerte eines Experimentes sowie deren Interaktion. Sie fand bei der statistischen Auswertung des MTT-Tests unter verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle mit Lösungsmittel Verwendung (Kapitel 3.2.1, S. 29).

2.4.2 Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Posttest

Der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Posttest prüft, ob sich die Messwerte eines Experiments in Abhängigkeit von einer unabhängigen, nicht-parametrischen Variable unterscheiden. Dieser Test wurde für die Auswertung des MTT-Tests bei Patientenproben nach 24h Inkubation mit verschiedenen Sorafenibkonzentrationen verwendet (Kapitel 3.5.1, S. 45).

2.5 Patientenproben

Die Patientenproben stellten zu diagnostischen Zwecken entnommenes, archiviertes Material dar, welches andernfalls verworfen worden wäre. Die Handhabung der Patientendaten erfolgte anonymisiert nach den Grundsätzen der guten klinischen Praxis (GCP). In einem Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät (9/9/09) waren keine grundsätzlichen ethischen oder rechtlichen Bedenken erhoben worden.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung von Sorafenib-Zielstrukturen in einem Panel von aggressiven Lymphomen

Mittels Western-Blot und Durchflusszytometrie wurde zunächst die Expression der klassischen Sorafenib-Zielstrukturen in einer Auswahl von aggressiven Lymphomen untersucht (vgl. Kapitel 1.3, S. 4 sowie WILHELM ET AL. 2004).

Hierzu erfolgte nach Lyse und Proteinnormierung der Zellen eine gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine mit anschließender Immundetektion der Raf-Proteine A, B und C sowie deren Phosphorylierung (vgl. Kapitel 2.3, S. 20). Die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 wurde als bekannte Positivkontrolle verwendet. Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

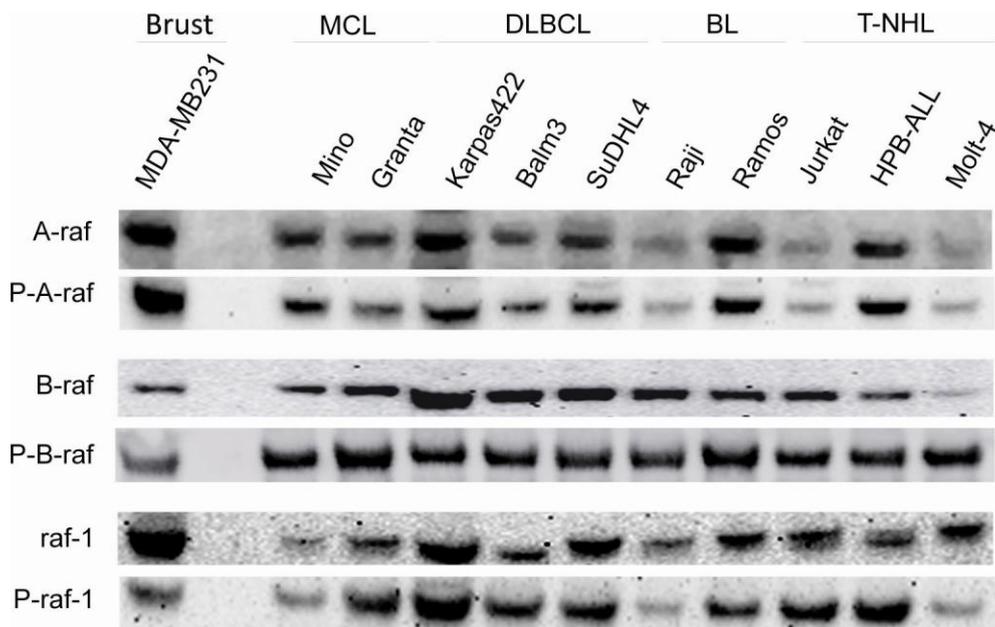


Abbildung 4: Raf-Expression in Lymphomzelllinien

Western-Blot-Analyse der Raf-Kinasen A, B und C sowie deren Phosphorylierung bei aggressiven Lymphomzelllinien und der Kontrollzelllinie MDA-MB-231.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (vgl. Kapitel 2.2.6, S. 16) wurden die Expressionsgrade der membranständigen Rezeptortyrosinkinase-Proteine VEGF-R, PDGF-R, Flt3 und c-kit bei ausgewählten Lymphomzelllinien untersucht. Die gemessenen Signalstärken wurden in Histogrammen aufgetragen und mit den Signalstärken der ungefärbt gemessenen Kontrollen verglichen (Abbildung 5 und Abbildung 6). Die ausführlichen Ergebnisse wurden als Tabelle 8 zusammengefasst.

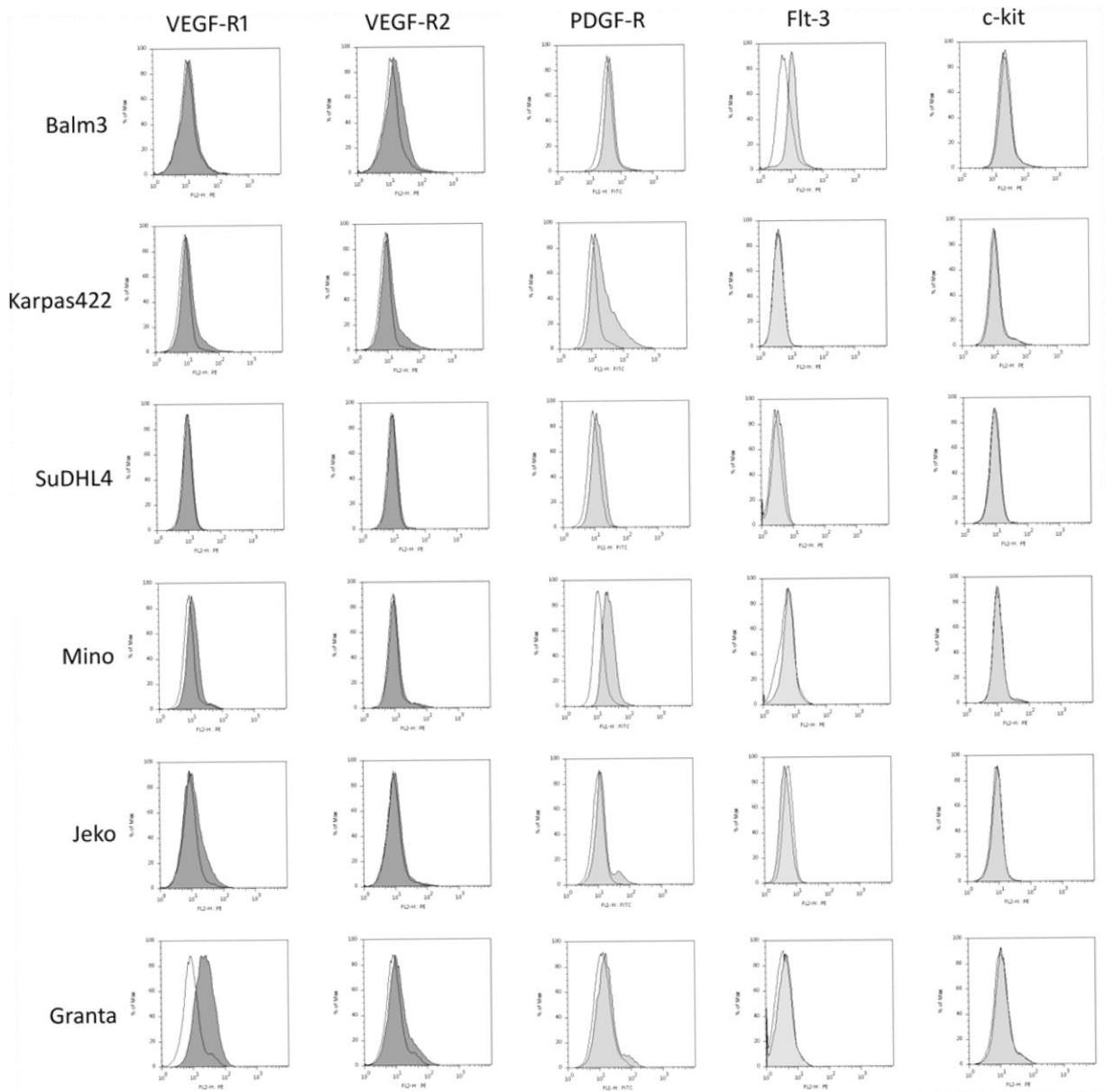


Abbildung 5: Expression von Rezeptortyrosinkinasen bei DLBCL und MCL

Die Expressionsgrade der Rezeptortyrosinkinasenproteine VEGF-R1, VEGF-R2, PDGF-R, Flt-3 und c-kit wurden mittels Durchflusszytrophotometrie bestimmt und mit Kontrollen ohne Inkubation mit jeweiligen Antikörpern verglichen. In den abgebildeten Histogrammen entsprechen die grauen Kurven den Rezeptortyrosinkinasenfärbungen und die ungefärbten Kurven den Kontrollen.

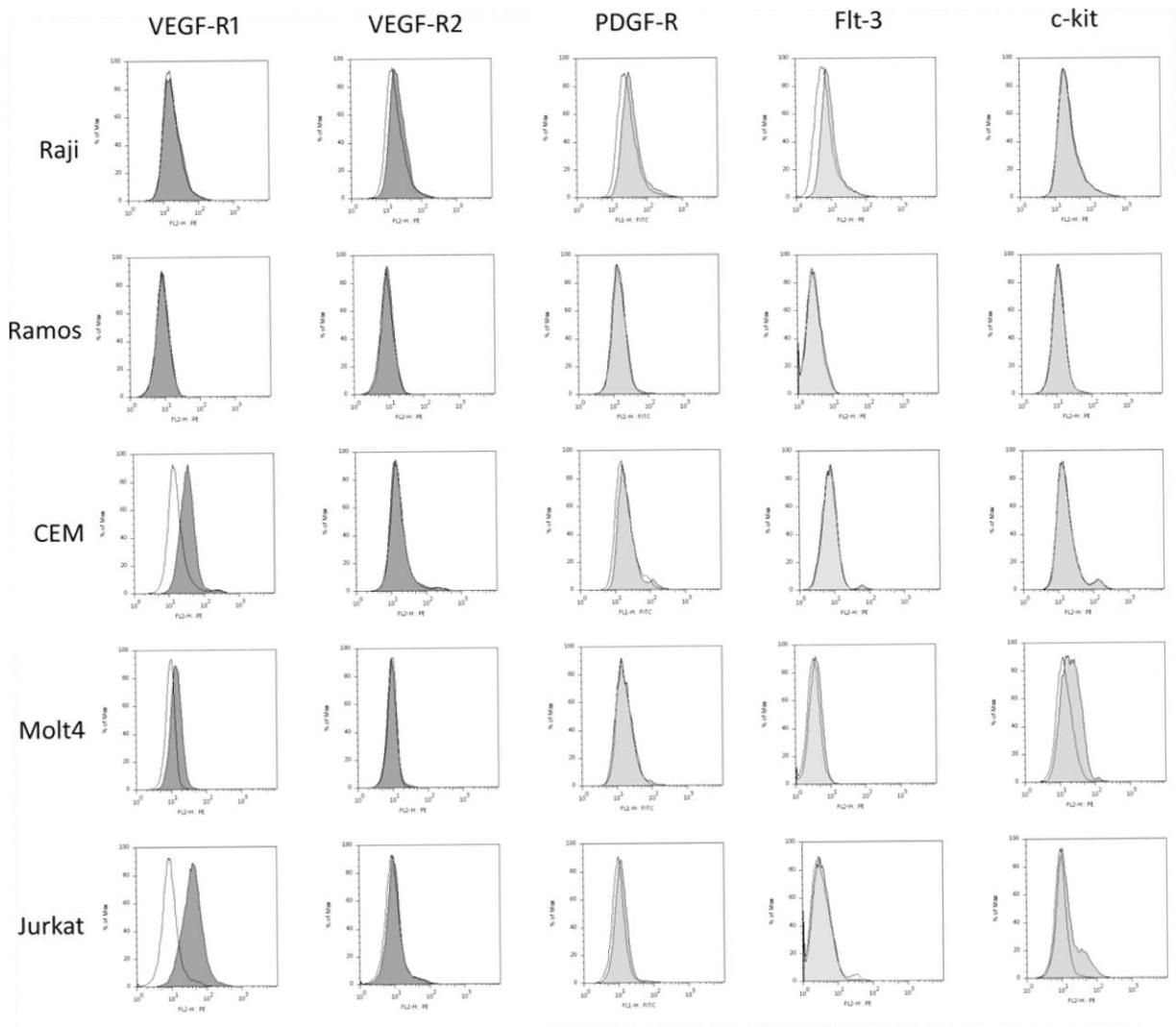


Abbildung 6: Expression von Rezeptortyrosinkinasen bei BL und T-NHL

Die Expressionsgrade der Rezeptortyrosinkinasenproteine VEGF-R1, VEGF-R2, PDGF-R, Flt-3 und c-kit wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt und mit Kontrollen ohne Inkubation mit jeweiligen Antikörpern verglichen. In den abgebildeten Histogrammen entsprechen die grauen Kurven den Rezeptortyrosinkinasefärbungen und die ungefärbten Kurven den Kontrollen.

Tabelle 8: Expression von Rezeptortyrosinkinasen bei Lymphomzelllinien

Zusammenstellung der durchflusszytometrischen Untersuchungen aus Abbildung 5 und Abbildung 6. Deutliches Signal (++), moderates Signal (+), kein stärkeres Signal (-).

| | DLBCL | | | MCL | | | BL | | T-NHL | | |
|----------------|-------|------------|----------|------|------|------------|------|-------|----------|--------|--------|
| | Balm3 | Karpas 422 | SU-DHL-4 | Mino | Jeko | Granta 519 | Raji | Ramos | CCRF-CEM | Molt-4 | Jurkat |
| VEGF-R1 | + | + | - | + | + | ++ | - | - | ++ | + | ++ |
| VEGF-R2 | + | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + |
| PDGF-R | + | ++ | + | ++ | + | + | + | - | + | - | + |
| Flt3 | ++ | - | + | - | - | + | + | - | - | - | - |
| c-kit | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |

Die Expressionsanalyse der klassischen Sorafenib-Zielstrukturen ergab, dass die Raf-Kinasen A, B und C übereinstimmend in allen untersuchten aggressiven Lymphomen exprimiert und phosphoryliert vorliegen. Bei den Rezeptortyrosinkinasen zeigte sich ein heterogenes Bild. VEGF-R1 wird besonders stark in den T-NHL-Zelllinien CCRF-CEM und Jurkat sowie der MCL-Zelllinie Granta 519 exprimiert, während VEGF-R2 hingegen bei keiner der untersuchten Entitäten vermehrt exprimiert wird. PDGF-R zeigt verstärkte Aktivität bei der DLBCL-Zelllinie Karpas 422 und bei der MCL-Zelllinie Mino. Des Weiteren zeigte sich, dass c-kit bei keiner der untersuchten Zelllinien vermehrt exprimiert wird und dass Flt3 nur bei dem DLBCL Balm3 vorhanden ist.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass Zielstrukturen in aggressiven Lymphomen in heterogener Ausprägung, in der Regel mit mehreren Tyrosinkinasen simultan pro Zelllinie, exprimiert werden.

3.2 Analyse der zytotoxischen Wirkung von Sorafenib nach Kurzzeitexposition

3.2.1 MTT-Test

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen (Kapitel 3.1) legten eine Untersuchung der Zellviabilität unter Sorafenibexposition nahe.

Hierzu wurde mit dem MTT-Test (vgl. Kapitel 2.2.7.1, S. 17) die Stoffwechselaktivität der verschiedenen Lymphomentitäten nach 24-stündiger Behandlung mit Sorafenib gemessen (vgl. Tabelle 5). Als Kontrollen dienten Inkubationen mit reinem Zellkulturmedium (Mediumkontrolle) sowie mit äquivalenten DMSO-Volumina (DMSO-Kontrolle), da Sorafenib in DMSO gelöst wird.

In Abbildung 7 sind die Mittelwerte der gemessenen Triplikate als Prozentwert der unbehandelten Mediumkontrolle angegeben. Sie stellen repräsentative, typische Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Versuchen mit jeder Zelllinie dar. Die Differenzen zwischen den Werten der Sorafenibproben und den DMSO-Kontrollen wurden mittels Two-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Posttest verifiziert (vgl. Kapitel 2.4.1, S. 25).

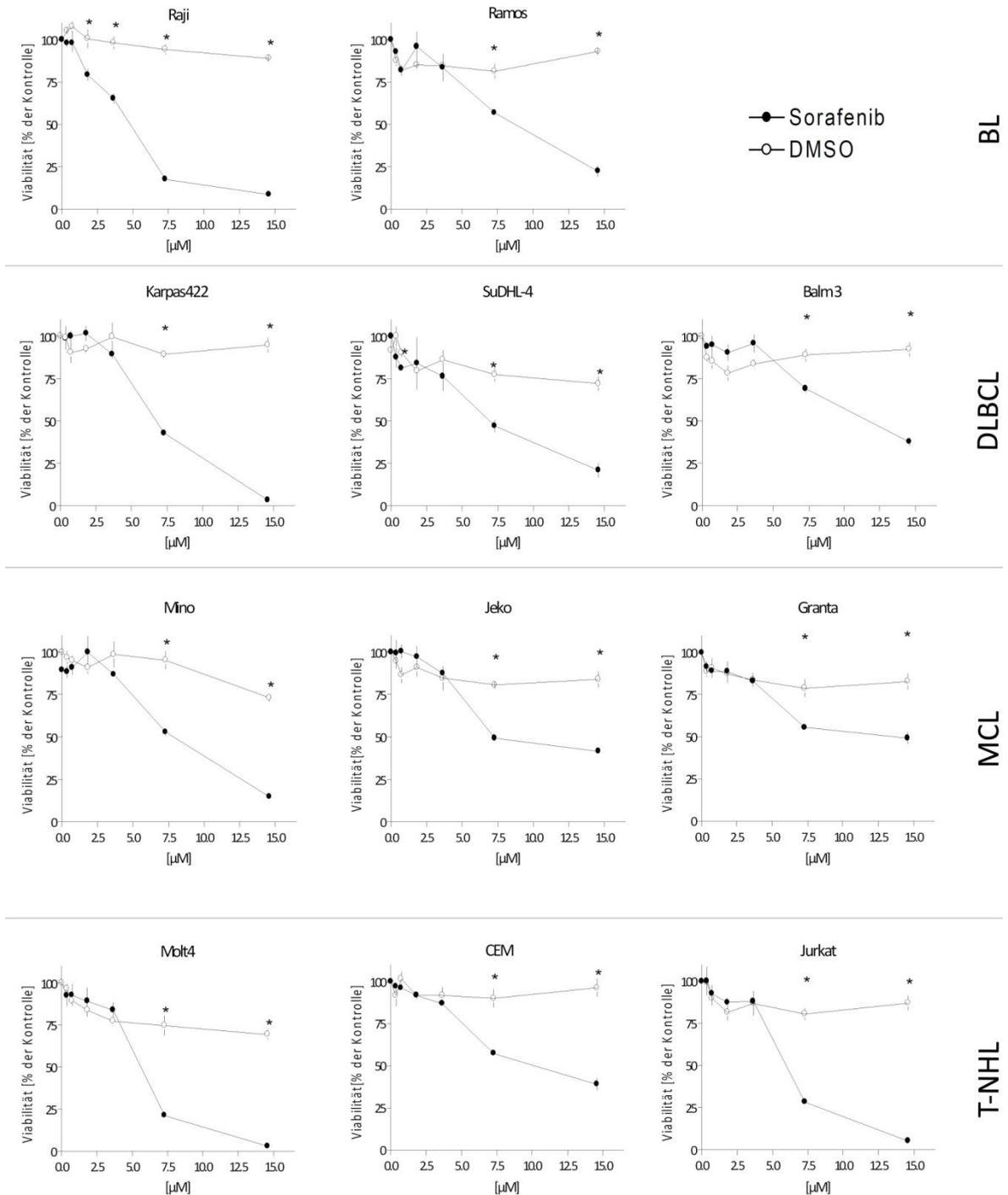


Abbildung 7: Viabilität von aggressiven Lymphomen nach Inkubation mit Sorafenib

Dargestellt sind die Ergebnisse von MTT-Tests nach 24-stündiger Inkubation mit ansteigenden Sorafenibkonzentrationen bei mehreren Zelllinien verschiedener Lymphomentitäten. Als Vergleich diente eine jeweils entsprechende Inkubation mit DMSO. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ sind mit Sternchen markiert (*).

Es zeigte sich, dass Sorafenib die Viabilität in allen untersuchten Zelllinien dosisabhängig reduzierte. Eine EC_{50} , also diejenige Konzentration, durch die eine Viabilitätsminderung um 50 % *in vitro* erzielt wird, konnte bestimmt werden. Die EC_{50} lag mit Werten zwischen 4,3 µM und 8 µM (vgl. Tabelle 9) für alle Zelllinien in Bereichen, die klinisch erreichbar sind (WILHELM ET AL. 2004; STRUMBERG ET AL. 2005).

Tabelle 9: EC₅₀ nach 24-stündiger Inkubation mit Sorafenib

Die EC₅₀ wurde mit einer sigmoiden Ausgleichskurve aus den MTT-Tests der Abbildung 7 berechnet. Die EC₅₀ lag für alle untersuchten Zelllinien in einem klinisch relevanten Bereich.

| Entität | Zelllinie | EC ₅₀ [µM] | 95% Konfidenzintervall [µM] |
|--------------|------------|-----------------------|-----------------------------|
| BL | Raji | 4,3 | 3,3 – 5,6 |
| | Ramos | 8,0 | 4,5 – 14,2 |
| DLBCL | Karpas 422 | 6,9 | 6,3 – 7,5 |
| | SU-DHL-4 | 7,0 | 4,3 – 11,5 |
| | Balm3 | 6,7 | 6,0 – 7,4 |
| MCL | Mino | 7,5 | 6,6 – 8,6 |
| | Jeko | 4,9 | 4,0 – 6,1 |
| | Granta 519 | 6,5 | 5,6 – 7,5 |
| T-NHL | Molt-4 | 5,7 | 4,8 – 6,7 |
| | CCRF-CEM | 6,2 | 5,2 – 7,3 |
| | Jurkat | 5,9 | 5,1 – 6,9 |

3.2.2 Apoptose

Die Viabilitätsminderung durch Sorafenib bei den Lymphomzelllinien führte zu der Frage nach einer putativen Apoptoseinduktion. Hierzu wurde die Annexin-V-Fluos / PI - Doppelfärbung verwendet (vgl. Kapitel 2.2.7.2, S. 18), in der frühapoptotische Zellen von spätapoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden können.

Zunächst wurde beispielhaft für die DLBCL-Zelllinie SU-DHL-4 und die T-NHL-Zelllinie Jurkat ein orientierender Vorversuch mit den Variablen Sorafenibdosis und Zeit durchgeführt. Die Dotplots der durchflusszytometrischen Messungen sind in Abbildung 8 zusammengestellt.

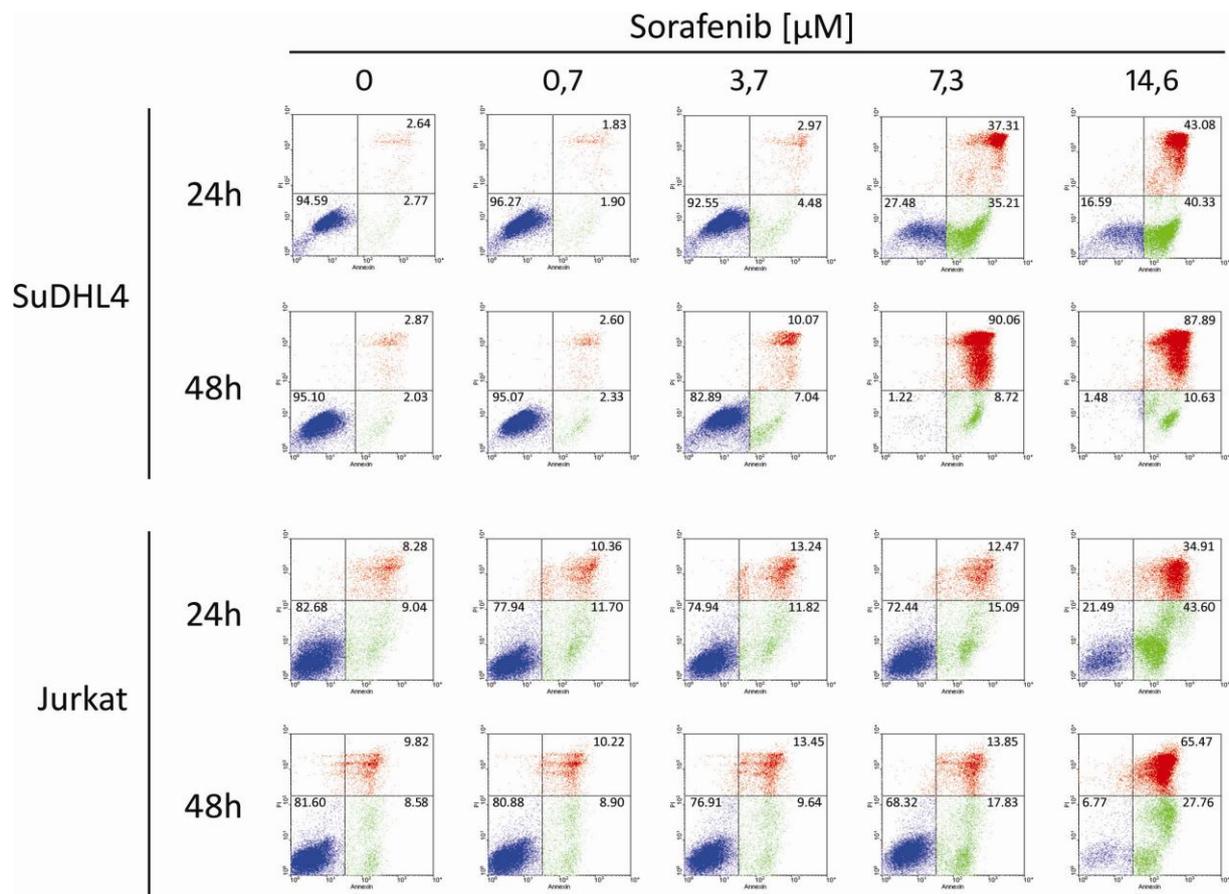


Abbildung 8: Apoptoseinduktion durch Sorafenib – Dotplots

Die DLBCL-Zelllinie SU-DHL-4 und die T-NHL-Zelllinie Jurkat wurden für 24 h und 48 h mit ansteigender Sorafenibdosis inkubiert und anschließend mit einer Annexin-V-Fluos / PI – Doppelfärbung auf Apoptose untersucht. Die blau dargestellte Zellgruppe entspricht den ungefärbten, vitalen Zellen, die grüne den früh-apoptotischen und die rote den spät-apoptotischen Zellen. In den jeweiligen Quadranten des Dotplots ist der prozentuale Anteil der gefärbten Population an allen gemessenen Events angegeben.

Die Ergebnisse der Abbildung 8 zeigen eine dosis- und zeitabhängige apoptoseinduzierende Wirkung von Sorafenib bei SU-DHL-4 und Jurkat. Ob Sorafenib auch bei den übrigen ausgewählten Lymphomzelllinien Apoptose induziert, sollte im Folgenden untersucht werden. Die Zellen wurden für 24, 48 und 72 Stunden mit 7,3 μM Sorafenib inkubiert und anschließend, wie im Vorversuch, mit Annexin-V-Fluos sowie PI gefärbt und im FACS gemessen. Als Kontrolle diente eine Inkubation mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels DMSO, in dem Sorafenib gelöst wurde. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe als Balkendiagramm zur besseren Übersicht zusammengefasst.

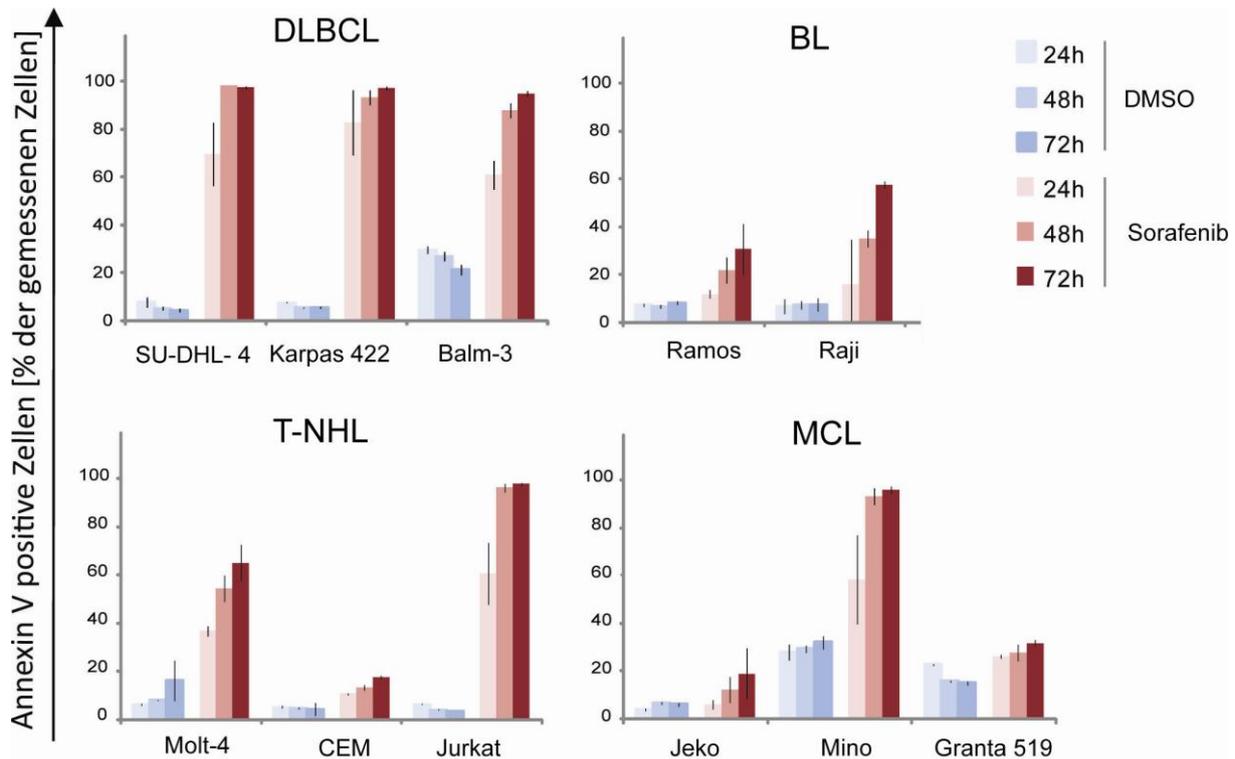


Abbildung 9: Apoptoseinduktion durch Sorafenib – Balkendiagramm

Dargestellt ist der Anteil der Annexin-V-Fluos-positiven, apoptotischen Zellen an allen gemessenen Events mit der entsprechenden Standardabweichung des Triplikats. Die Zellen sind vor der Färbung für 24, 48 und 72 h mit 7,3 μ M Sorafenib inkubiert worden. Mit DMSO behandelte Zellen dienen als Kontrolle.

Die Ergebnisse der in Abbildung 9 dargestellten Versuche bestätigten die Ergebnisse des orientierenden Vorversuchs (Abbildung 8) und zeigten, dass Sorafenib in allen untersuchten Lymphomzelllinien zeitabhängig Apoptose induzierte.

3.2.3 Zellzyklus

Die viabilitätsmindernde und apoptoseinduzierende Wirkung von Sorafenib bei Lymphomzelllinien legte eine Zellzyklusanalyse unter Sorafenibexposition nahe (vgl. Kapitel 2.2.9, S. 19). Es wurden auch hier zunächst ausgewählte Zelllinien für 24 und 48 Stunden mit ansteigenden Sorafenibkonzentrationen inkubiert und analysiert. Anschließend wurden von jeder untersuchten Entität weitere Lymphomzelllinien für 48 Stunden mit 7,3 μ M Sorafenib inkubiert und die Effekte auf den Zellzyklus untersucht. Als Kontrolle diente erneut eine entsprechende Inkubation mit DMSO. Abbildung 10 zeigt exemplarisch die mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Histogramme der Zellzyklusanalyse.

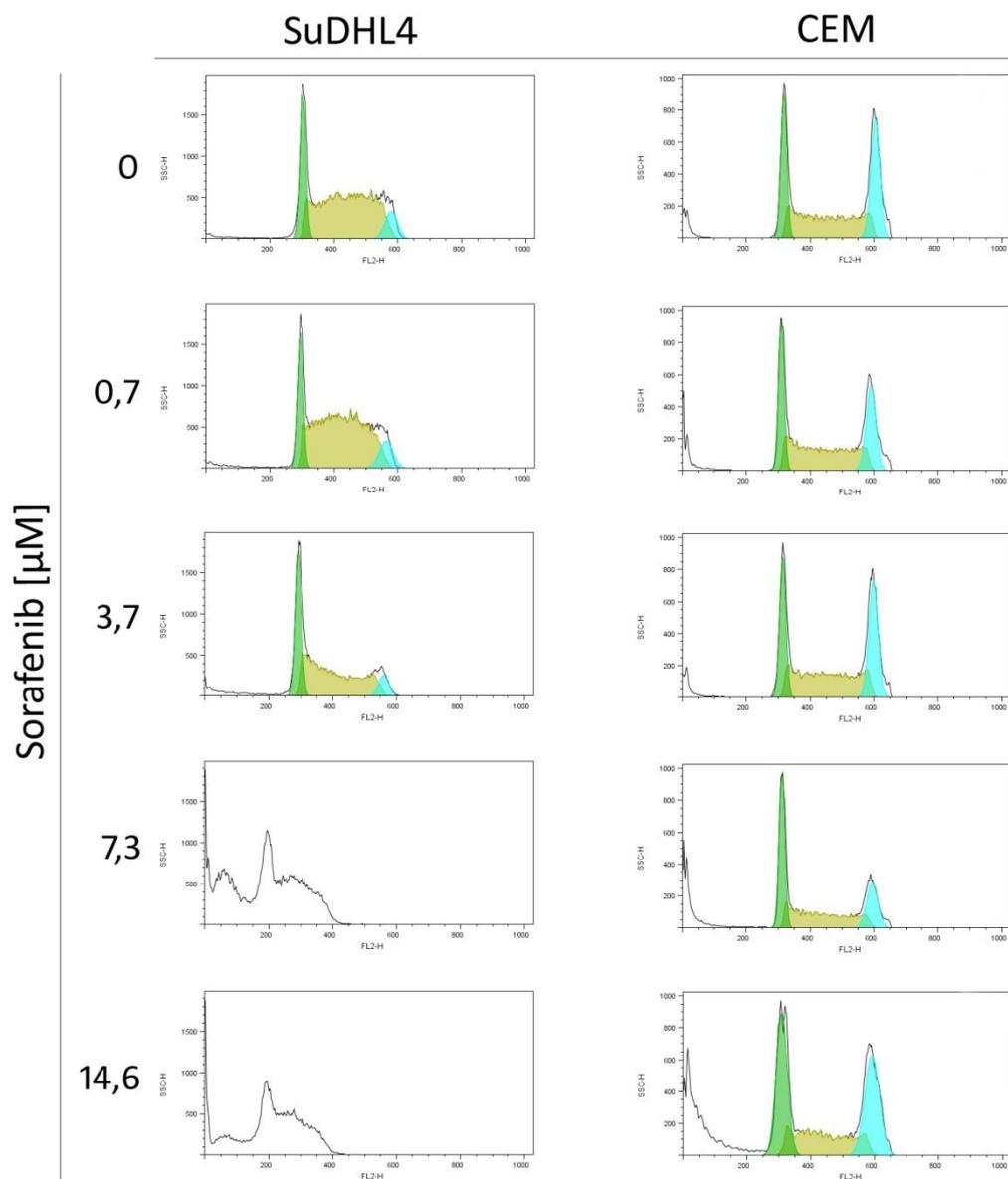


Abbildung 10: Histogramme der Zellzyklusanalyse

Die untersuchten Zelllinien SU-DHL-4 und CCRF-CEM wurden für 48 h mit ansteigenden Konzentrationen Sorafenib inkubiert und anschließend mit PI-haltigem Zellzyklusanalysepuffer behandelt. Die durchflusszytometrisch ermittelten Histogramme ermöglichten die Analyse des Zellzyklus (grün: G1-Phase; braun: S-Phase; blau: G2-Phase).

Während bei SU-DHL-4 dosis- und zeitabhängig der Anteil der Sub G0-Fraktion zunahm und die typische Zellzykluskonfiguration immer weiter verloren ging, nahm bei CCRF-CEM hingegen zwar der Anteil der Sub G0-Fraktion und somit die Menge an fragmentierter DNA zu und die Synthese-Phase (S-Phase) brach ein, jedoch blieben die unterschiedlichen Zellzyklusphasen weiterhin erhalten (siehe Abbildung 10).

Es folgte die ausführliche Analyse des Zellzyklus von SU-DHL-4, Karpas 422 und CCRF-CEM unter zunehmender Sorafenibexposition. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 11 zusammenfassend dargestellt.

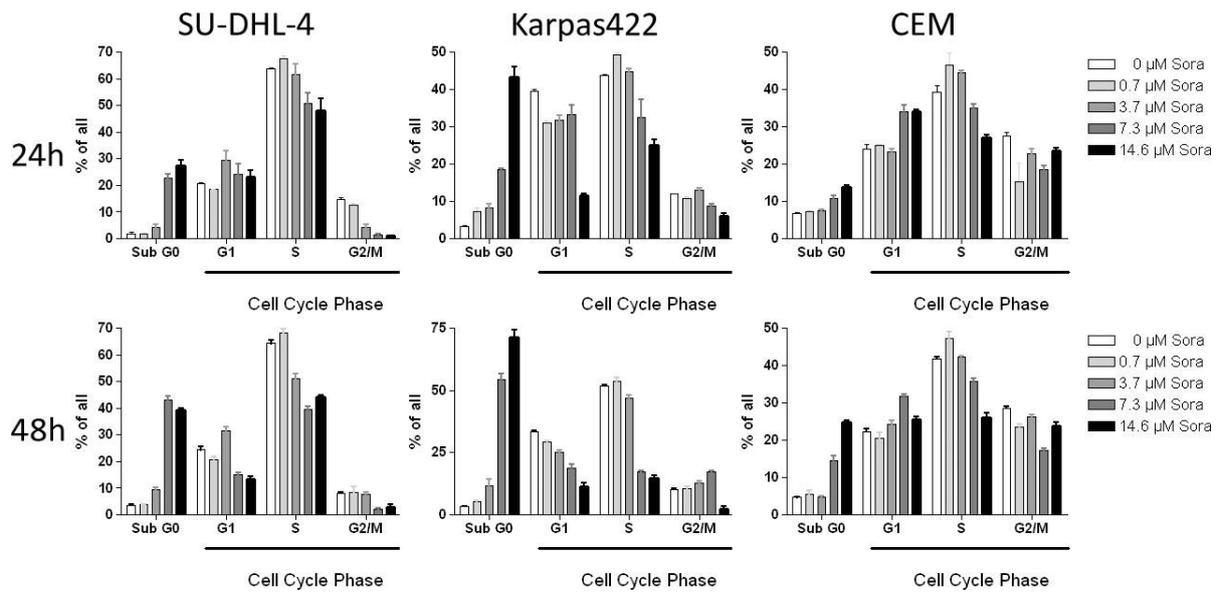


Abbildung 11: Zellzyklusanalyse in Abhängigkeit von Dosis und Inkubationszeit

Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse von SU-DHL-4, Karpas 422 und CCRF-CEM sind als Balkendiagramme dargestellt. Angegeben sind die prozentualen Mittelwerte aller gemessenen Zellen geordnet nach den Zellzyklusphasen G1, S und G2 sowie dem apoptotischen Anteil (Sub G0).

In Abbildung 11 ist deutlich zu sehen, wie bei allen drei Zelllinien der Anteil an apoptotischen Zellen mit fragmentierter DNA (Sub G0) dosis- und zeitabhängig zunimmt, während die übrigen Zellzyklusphasen G1, S und G2 anteilig abnehmen. Untersuchungen an weiteren Zelllinien nach 48 Stunden Inkubation mit 7,3 μM Sorafenib konnten diese Ergebnisse durchgängig bestätigen und sind in Abbildung 12 nach Entitäten geordnet ebenfalls als Balkendiagramm zusammengefasst.

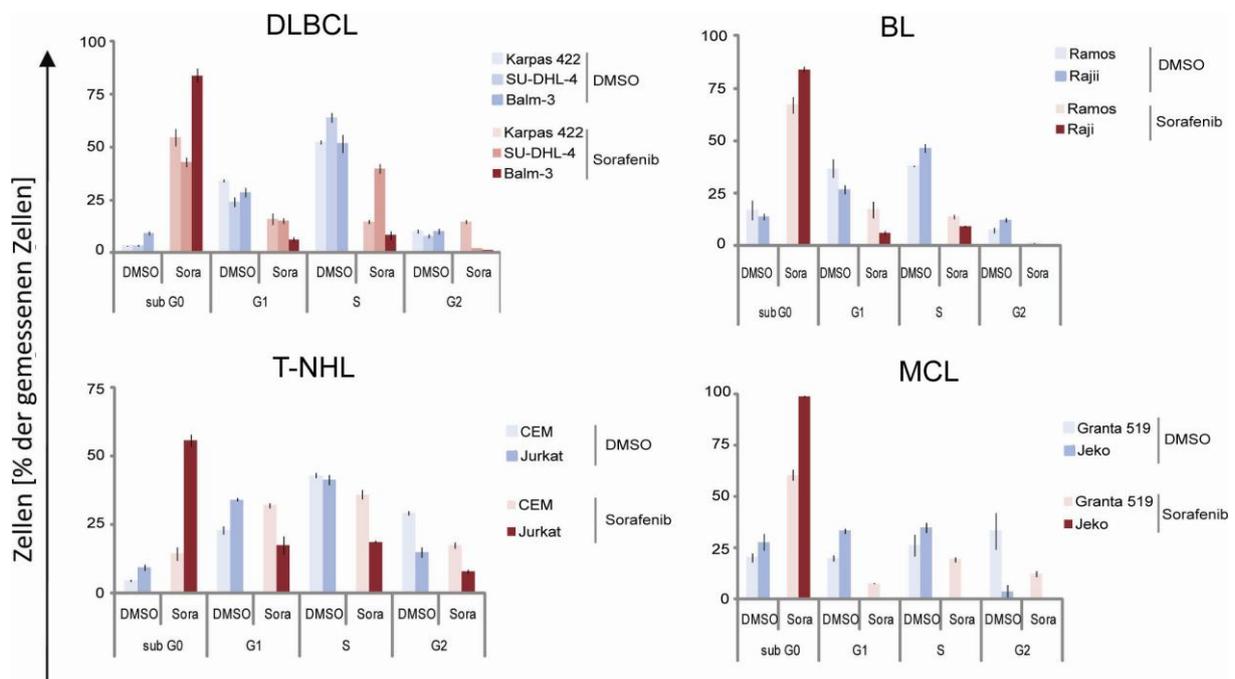


Abbildung 12: Wirkung von Sorafenib auf den Zellzyklus ausgewählter Lymphomzelllinien

Dargestellt sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse verschiedener Lymphomzelllinien nach 48-stündiger Inkubation mit 7,3 μM Sorafenib im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollen.

3.3 Untersuchung nach Langzeitexposition von Sorafenib

3.3.1 Wachstum unter Langzeitexposition

Die Erkenntnisse über die zytotoxische Wirkung von Sorafenib auf Lymphomzelllinien unter Kurzzeitexposition führten zur Untersuchung des Effektes von Sorafenib nach Langzeitexposition.

In einem ersten Versuchsabschnitt wurden die Zelllinien für zehn Tage mit Sorafenib oder DMSO als Kontrolle unter ansonsten unveränderten Zellkulturbedingungen exponiert (vgl. Kapitel 2.2.3, S. 20 und Kapitel 2.2.7.3, S. 19). Jeden zweiten Tag wurde die Zellzahl der Kultur bestimmt und frisches Zellkulturmedium sowie Sorafenib oder DMSO hinzugegeben. In einem zweiten Versuchsabschnitt wurden die Zellen nach zehntägiger Sorafenibexposition für weitere Untersuchungen verwendet (Kapitel 3.3.2 und Kapitel 3.3.3). Die Ergebnisse des Zellwachstums unter kontinuierlicher Sorafenibexposition über zehn Tage sind in Abbildung 13 und in Abbildung 14 als Wachstumskurven dargestellt.

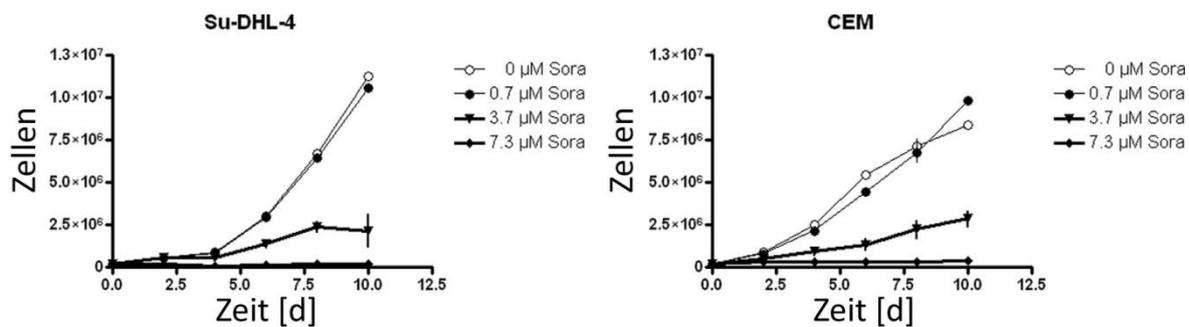


Abbildung 13: Zellwachstum unter kontinuierlicher Sorafenibexposition über zehn Tage

Die Lymphomzelllinien SU-DHL-4 und CCRF-CEM wurden für zehn Tage mit ansteigenden Sorafenibkonzentrationen behandelt. Die Zellzahl wurde jeden zweiten Tag bestimmt und hier als Wachstumskurve dargestellt. Als Vergleich dienten entsprechend mit DMSO behandelte Kontrollansätze.

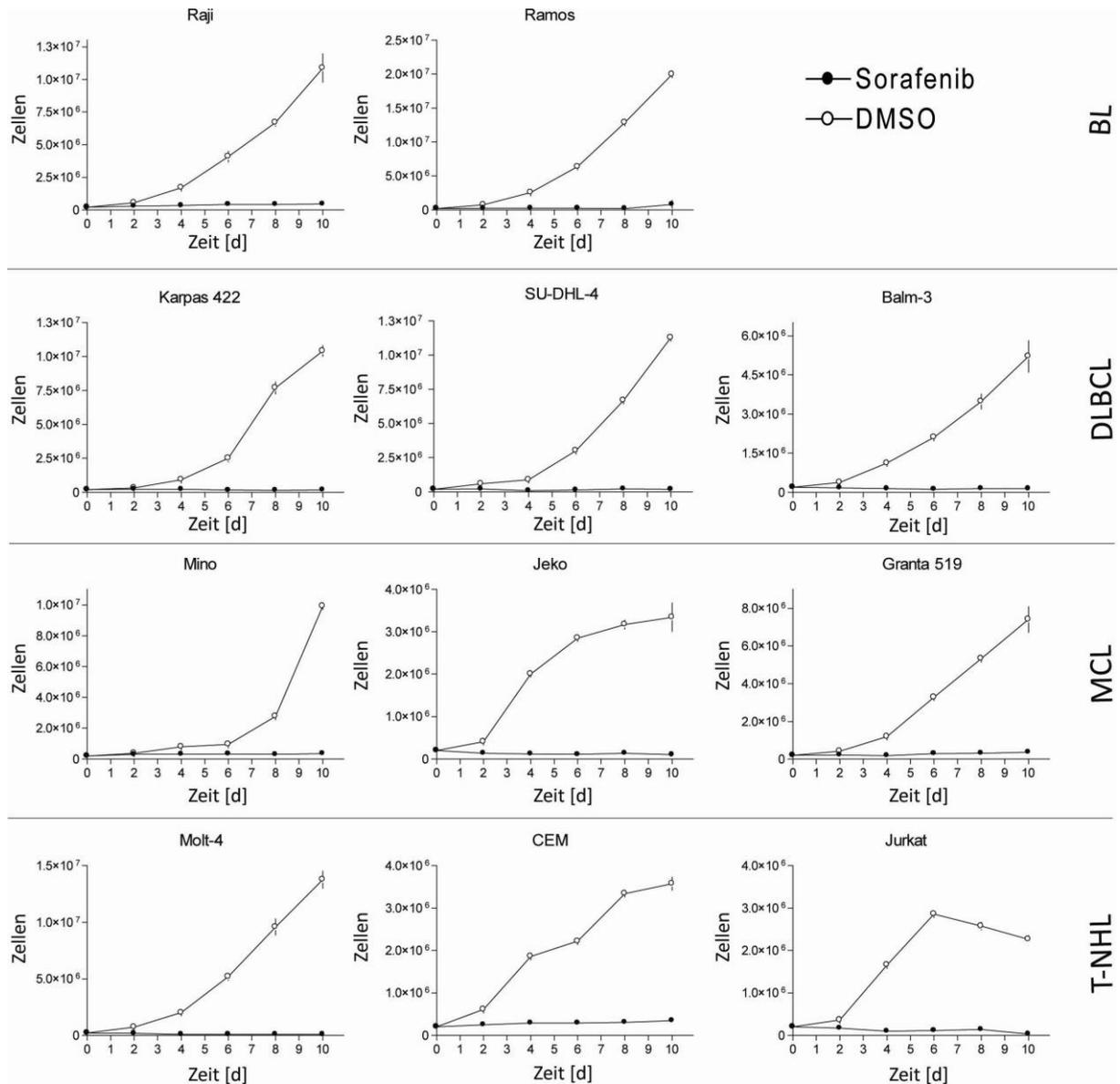


Abbildung 14: Zellwachstum unter kontinuierlicher Sorafenibexposition über zehn Tage

Die verschiedenen Lymphomzelllinien wurden für zehn Tage mit 7,3 μM Sorafenib oder DMSO behandelt. Die Zellzahl wurde jeden zweiten Tag bestimmt und hier als Wachstumskurve dargestellt.

Sorafenib hemmte in allen untersuchten Lymphomzelllinien das Zellwachstum während dieser zehn Tage, während die mit DMSO behandelten Kontrollen exponentiell wuchsen. Diese Wachstumshemmung durch Sorafenib war dosisabhängig und zeigte bereits unterhalb der direkt zytotoxischen Wirkung von 7,3 μM einen starken Effekt (vgl. Abbildung 13).

3.3.2 Apoptose

Anschließend an die in Kapitel 3.3.1 beschriebene Langzeitexposition wurde mittels Annexin-V-Fluos / PI-Doppelfärbung und Durchflusszytometrie (vgl. Kapitel 2.2.7.2, S. 18 und Kapitel 3.2.2) der Anteil der apoptotischen Zellen in der Kultur an Tag zehn bestimmt.

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Messungen zusammengefasst. Bei den mit 7,3 μM Sorafenib behandelten Zellen fanden sich je nach Entität zwischen 93,5 % (Karpas 422 und SU-DHL-4) und 39,7 % (Jeko) apoptotische Zellen.

Tabelle 10: Bestimmung der apoptotischen Zellen nach zehntägiger Sorafenibexposition

Nach zehntägiger Behandlung mit 7,3 μM Sorafenib wurde der Anteil der apoptotischen Zellen unter den verbleibenden Zellen bestimmt. Angegeben ist der Mittelwert der gemessenen Triplikate mit entsprechender Standardabweichung.

| | Anteil apoptotischer Zellen an Tag 10[%] |
|-------------------|--|
| Balm3 | 89,9 \pm 0,2 |
| Karpas 422 | 93,5 \pm 0,9 |
| SU-DHL-4 | 93,5 \pm 0,3 |
| Granta 519 | 75,8 \pm 1,2 |
| Jeko | 39,7 \pm 3,9 |
| Jurkat | 78,3 \pm 0,1 |
| CCRF-CEM | 75,1 \pm 0,4 |
| Raji | 84,8 \pm 1,1 |
| Ramos | 89,2 \pm 1,7 |

Ergänzend hierzu bestätigten die Messungen nach der zehntägigen Behandlung mit ansteigenden Sorafenibkonzentrationen auch unter Langzeitexposition eine dosis- und zeitabhängige Wirkung von Sorafenib (Tabelle 11).

Tabelle 11: Bestimmung der apoptotischen Zellen nach zehntägiger Sorafenibexposition ansteigender Konzentrationen

Die Zelllinie CCRF-CEM wurde für zehn Tage mit ansteigenden Sorafenibkonzentrationen oder DMSO (0) inkubiert. Anschließend wurde der Anteil der apoptotischen Zellen unter den verbliebenen Zellen an Tag zehn bestimmt.

| | Anteil apoptotischer Zellen | | | |
|--|-----------------------------|---------------|----------------|----------------|
| Sorafenibkonzentration [μM] | 0 | 0,7 | 3,7 | 7,3 |
| CCRF-CEM [%] | 6,4 \pm 0,4 | 7,3 \pm 0,9 | 11,8 \pm 3,9 | 75,1 \pm 6,3 |

3.3.3 Klonogenität

Neben der Wirkung auf die Viabilität und das Wachstumsverhalten von Lymphomzelllinien unter kontinuierlicher Gabe von Sorafenib galt es im Weiteren zu untersuchen, ob der Einfluss von Sorafenib reversibel ist. Hierzu wurde, aufbauend auf dem in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Langzeitversuch, die Klonogenität der nach zehntägiger Sorafenibexposition verbliebenen Zellen bestimmt. Die mit Sorafenib oder DMSO behandelten Zellen wurden gewaschen und in Sorafenib-freier Methylzellulose für weitere zehn Tage inkubiert (vgl. Kapitel 2.2.8, S. 19). Anschließend wurde ausgezählt, wie viele Kolonien sich gebildet hatten und die CFU bestimmt. Die CFU gibt an, wie viele Kolonien sich aus 1000 ausgesäten Zellen innerhalb einer bestimmten Zeiteinheit bilden.

Abbildung 15 zeigt exemplarisch Fotos eines solchen Versuchs nach zehn Tagen. Die ausführlichen Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Während sich bei den mit DMSO vorbehandelten Ansätzen im Mittel bis zu 921 Kolonien gebildet haben (Balm3), hat sich bei den mit 7,3 μM Sorafenib vorbehandelten Zellen keine einzige Kolonie gebildet. Auch in diesem Versuchsabschnitt konnte die dosisabhängige Wirkung bestätigt werden (vgl. Tabelle 13).

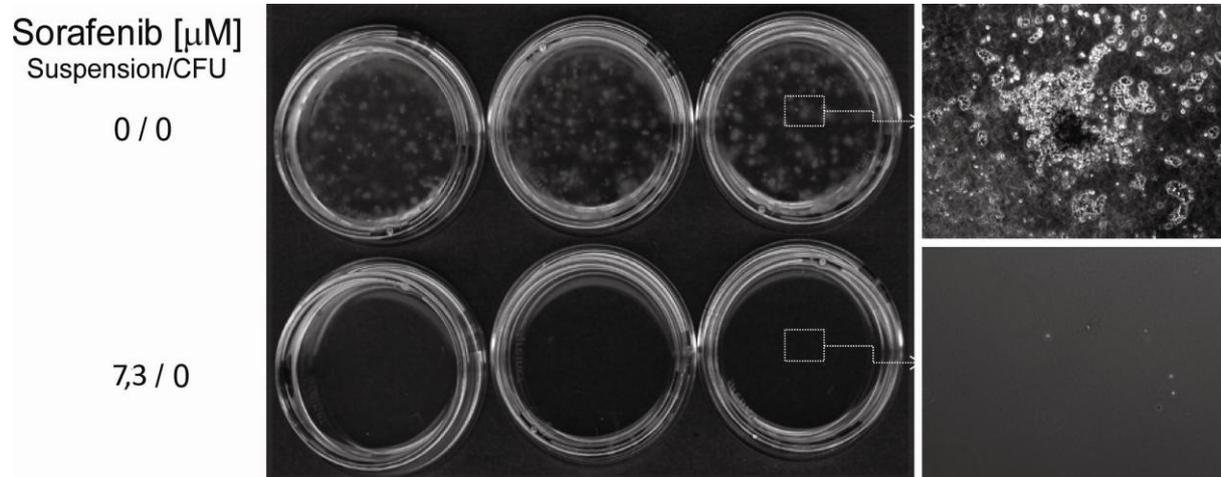


Abbildung 15: Klonogenität nach vorausgegangener Sorafenibbehandlung

Zellen der Zelllinie Ramos wurden zunächst für zehn Tage mit 7,3 μM Sorafenib behandelt (Suspension) und anschließend für weitere zehn Tage ohne Sorafenib in Methylzellulose ausgesät (CFU). Das Foto und die beiden Vergrößerungen sind an Tag 10 + 10 aufgenommen worden.

Tabelle 12: Colony Formation Unit (CFU) nach vorausgegangener Sorafenibexposition

Die unterschiedlichen Zelllinien wurden zunächst für zehn Tage mit 7,3 μM Sorafenib oder DMSO (0) behandelt und anschließend für weitere zehn Tage in Sorafenib-freier Methylzellulose inkubiert. Angegeben ist die Anzahl der entstandenen Kolonien (CFU) mit Standardabweichung.

| Sorafenibkonzentration [μM] | Anzahl der Kolonien an Tag 10 + 10 (CFU) | |
|--|--|-----|
| | 0 | 7,3 |
| Balm3 | 921 \pm 47 | 0 |
| Karpas 422 | 37 \pm 9 | 0 |
| SU-DHL-4 | 336 \pm 123 | 0 |
| Grant 519 | 252 \pm 70 | 0 |
| Mino | 50 \pm 5 | 0 |
| Jeko | 125 \pm 17 | 0 |
| Jurkat | 32 \pm 0 | 0 |
| CCRF-CEM | 485 \pm 13 | 0 |
| Molt-4 | 309 \pm 41 | 0 |
| Raji | 360 \pm 113 | 0 |
| Ramos | 819 \pm 91 | 0 |

Tabelle 13: CFU nach vorausgegangener Behandlung mit ansteigenden Sorafenibkonzentrationen

Die Zelllinien CCRF-CEM und SU-DHL-4 wurden zunächst für zehn Tage mit ansteigenden Konzentrationen Sorafenib oder DMSO (0) behandelt und anschließend für weitere zehn Tage in Sorafenib-freier Methylzellulose inkubiert. Angegeben ist die Anzahl der entstandenen Kolonien (CFU) mit Standardabweichung.

| Sorafenibkonzentration [μM] | Anzahl der Kolonien an Tag 10 + 10 (CFU) | | | |
|--|--|--------------|--------------|-----|
| | 0 | 0,7 | 3,7 | 7,3 |
| CCRF-CEM | 485 \pm 13 | 455 \pm 67 | 225 \pm 47 | 0 |
| SU-DHL-4 | 336 \pm 123 | 235 \pm 32 | 75 \pm 34 | 0 |

3.4 Identifizierung des Mechanismus

3.4.1 Western-Blot unter Sorafenibexposition für klassische Targets

Der zytostatische Effekt von Sorafenib auf Lymphomzelllinien führte zu der Frage nach dem molekularen Mechanismus. Hierzu wurden die ausgewählten Lymphomzelllinien mit ansteigenden Konzentrationen Sorafenib inkubiert, lysiert und nach Proteinnormierung gelelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Kapitel 2.3, S. 20). Es folgte ein Western-Blot mit anschließender Immundetektion der klassischen Sorafenib-Zielstrukturen A-, B- und C-Raf und ihrer phosphorylierten Formen (vgl. Kapitel 1.3, S. 4 und Kapitel 3.1) sowie von Actin als Proteinkontrolle. Das Ergebnis ist in Abbildung 16 dargestellt.

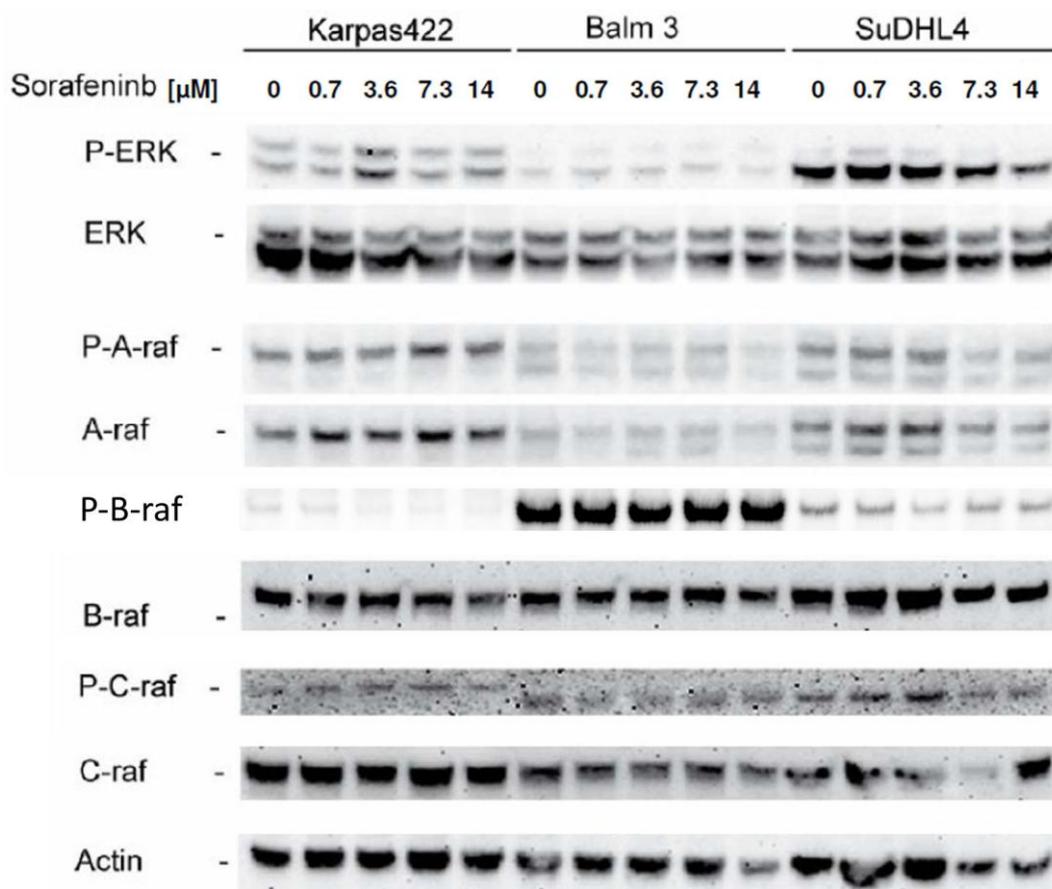


Abbildung 16: Wirkung von Sorafenib auf die Phosphorylierung von Raf-Kinasen in Lymphomzelllinien

Die Immundetektion von Raf-Kinase-Proteinen und deren Phosphorylierung an proteinnormierten Western-Blots zeigte bei den DLBCL-Zelllinien keinen einheitlichen Effekt von Sorafenib auf den Phosphorylierungsgrad der Raf-Kinasen.

Die Analyse der mit Sorafenib behandelten DLBCL-Zelllinien konnte keinen einheitlichen Effekt auf den Phosphorylierungsgrad der bekannten Sorafenib-Zielstrukturen der Raf-Kinase-Familie zeigen.

3.4.2 Array zur Identifizierung neuer Targets

Zur weiteren Untersuchung des molekularen Wirkmechanismus von Sorafenib wurden mit einem Kinase Screen Array 45 intrazelluläre Kinasen zeitgleich untersucht (vgl. Kapitel 2.3.6, S. 24). Dies sollte helfen, die Frage nach gemeinsamen Zielstrukturen von Sorafenib bei den ausgewählten Lymphomentitäten zu finden, nachdem dies für die klassischen Zielstrukturen ausgeschlossen worden war (Kapitel 3.4.1). Es wurden je zwei Zelllinien der Entitäten DLBCL, MCL und T-NHL ausgewählt, für zwei Stunden mit 7,3 μM Sorafenib oder DMSO inkubiert und anschließend für den Array aufbereitet und eingesetzt (vgl. Kapitel 2.3.6, S. 24).

Abbildung 17 zeigt zunächst exemplarisch das Röntgenbild einer Immundetektion eines solchen Kinase Screen Arrays. Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 20 zeigen anschließend die ausführliche Auswertung der Arrays für insgesamt sechs Lymphomzelllinien.

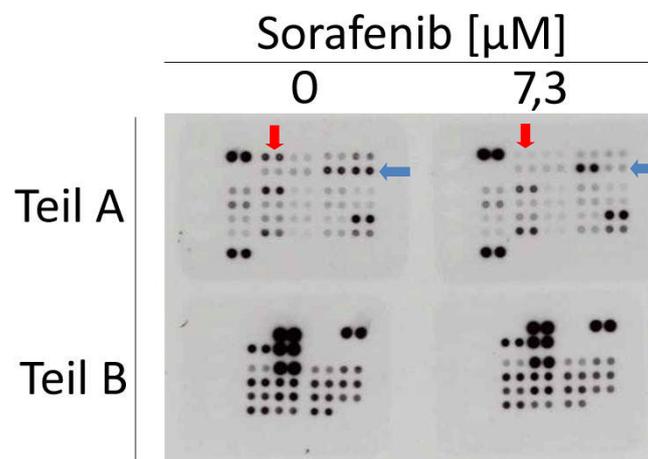


Abbildung 17: Kinase Screen Array der Lymphomzelllinie CCRF-CEM

Zellen der Lymphomzelllinie CCRF-CEM wurden zunächst mit 7,3 μM Sorafenib oder DMSO (0) inkubiert und dann mit einem zweiteiligen Kinase Screen Array analysiert. Zu sehen ist die Röntgenaufnahme der Immundetektion. Die untersuchten Kinasen und Kontrollen sind jeweils als Duplikat auf speziellen Membranen aufgetragen. Die roten Pfeile markieren das Signal der Kinase p38, die blauen Pfeile markieren das Signal der Kinase AKT.

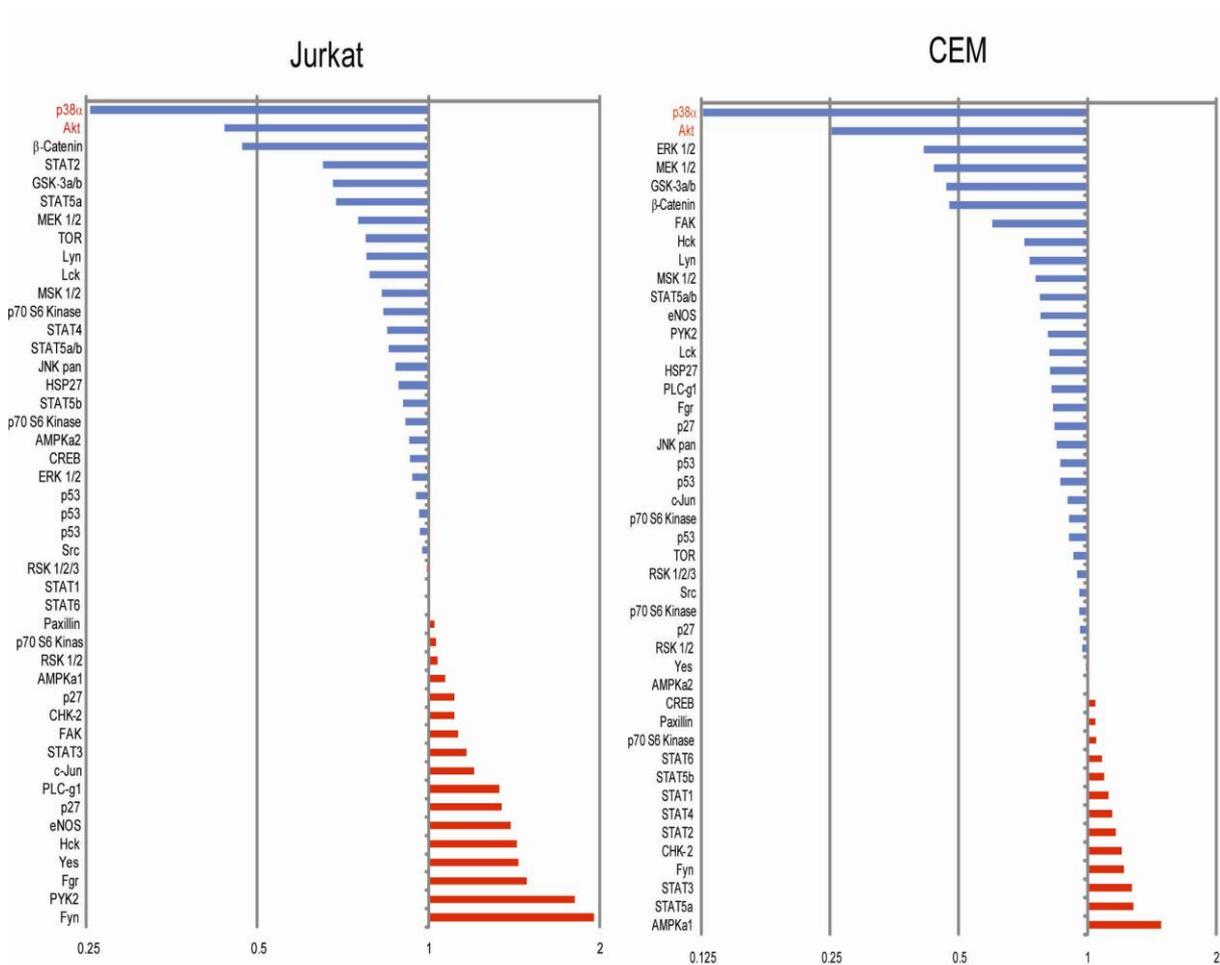


Abbildung 18: Auswertung des Kinase Screen Array der T-NHL-Zelllinien Jurkat und CCRF-CEM

Die Lymphomzelllinien Jurkat und CCRF-CEM sind jeweils mit 7,3 μ M Sorafenib und DMSO (0) inkubiert und anschließend mit dem Kinase Screen Array analysiert worden. Dargestellt ist die Differenz der Signalintensität zwischen der DMSO-Kontrolle und der Sorafenibinkubation. Blaue Balken zeigen eine Abnahme der Phosphorylierung an, rote Balken eine Zunahme der Signalintensität im Vergleich zur Kontrolle auf logarithmisch skaliertes x-Achse. Auf der y-Achse sind die 45 Kinasen entsprechend den Signalunterschieden geordnet.

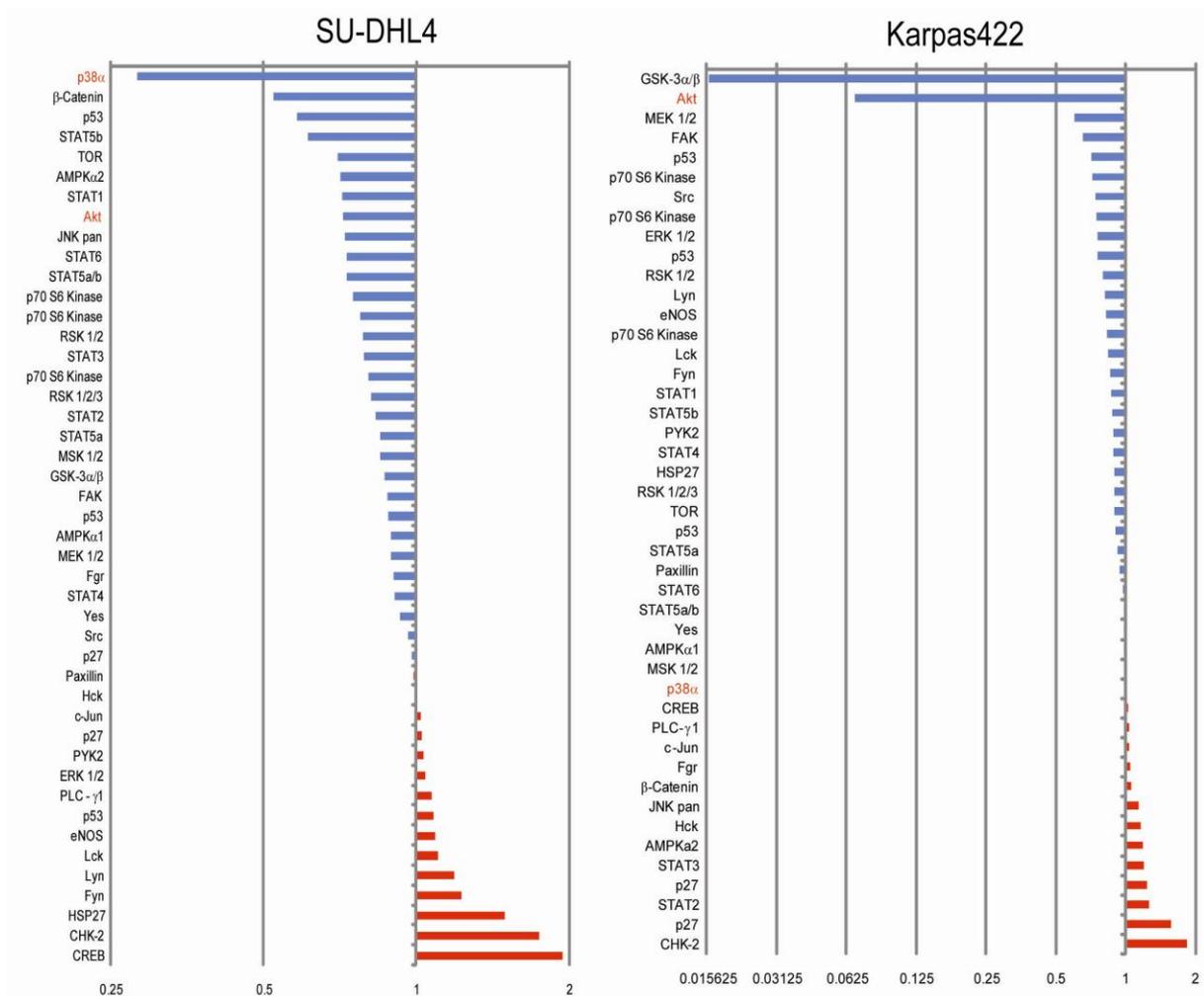


Abbildung 19: Auswertung des Kinase Screen Array der DLBCL-Zelllinien SU-DHL-4 und Karpas 422

Die Lymphomzelllinien SU-DHL-4 und Karpas 422 sind jeweils mit 7,3 μ M Sorafenib und DMSO (0) inkubiert und anschließend mit dem Kinase Screen Array analysiert worden. Dargestellt ist die Differenz der Signalintensität zwischen der DMSO-Kontrolle und der Sorafenibinkubation. Blaue Balken zeigen eine Abnahme der Phosphorylierung an, rote Balken eine Zunahme der Signalintensität im Vergleich zur Kontrolle auf logarithmisch skaliertem x-Achse. Auf der y-Achse sind die 45 Kinasen entsprechend den Signalunterschieden geordnet.

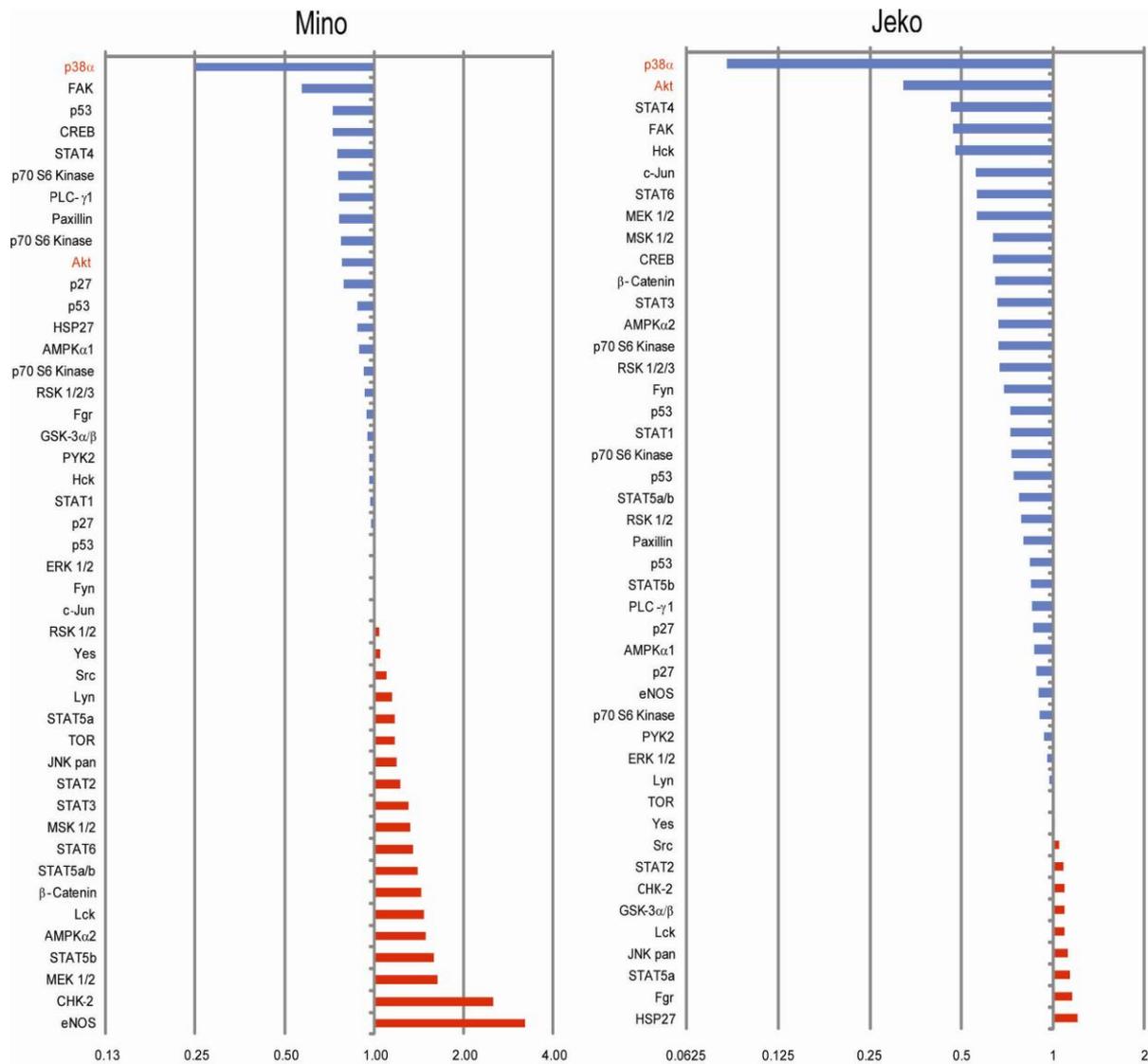


Abbildung 20: Auswertung des Kinase Screen Array der MCL-Zelllinien Mino und Jeko

Die Lymphomzelllinien Mino und Jeko sind jeweils mit 7,3 μ M Sorafenib und DMSO (0) inkubiert und anschließend mit dem Kinase Screen Array analysiert worden. Dargestellt ist die Differenz der Signalintensität zwischen der DMSO-Kontrolle und der Sorafenibinkubation. Blaue Balken zeigen eine Abnahme der Phosphorylierung an, rote Balken eine Zunahme der Signalintensität im Vergleich zur Kontrolle auf logarithmisch skalierte x-Achse. Auf der y-Achse sind die 45 Kinasen entsprechend den Signalunterschieden geordnet.

Die Analysen der Kinase Screen Arrays konnten zeigen, dass Sorafenib die Phosphorylierung mehrerer Kinasen beeinflusste. Im Hinblick auf einen putativen gleichartigen Wirkmechanismus für die verschiedenen Lymphomentitäten zeigte sich, dass vor allem die Phosphorylierung von p38 und AKT unter Sorafenibexposition bei Lymphomzelllinien abnahm. So war bei fünf von sechs untersuchten Zelllinien p38 die am stärksten inhibierte Kinase in der Arrayanalyse. Lediglich bei Karpas 422 ist AKT stärker inhibiert als p38.

3.4.3 Bestätigungs-Blots

Die Ergebnisse des Kinase Screen Array wurden nachfolgend mit einem Western-Blot und anschließender Immundetektion der Kinasen p38 und AKT überprüft. Hierzu wurden erneut Zellen für zwei Stunden mit ansteigenden Sorafenibkonzentrationen inkubiert, lysiert und proteinnormiert (Kapitel 2.3, S. 20). Die Bilder der Immundetektion sind in Abbildung 21 dargestellt.

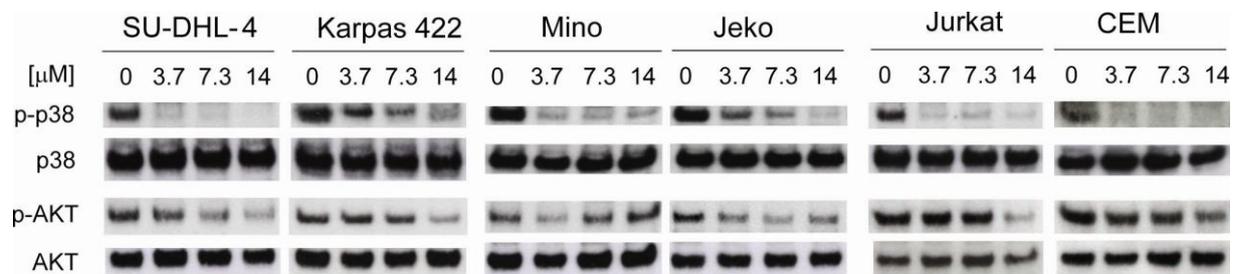


Abbildung 21: Western-Blot-Analysen der Proteinkinasen p38 und AKT nach zweistündiger Sorafenibexposition

Die sechs Lymphomzelllinien SU-DHL-4, Karpas 422, Mino, Jeko, Jurkat und CCRF-CEM wurden für zwei Stunden mit ansteigenden Konzentrationen Sorafenib inkubiert und anschließend mittels Western-Blot analysiert. Zu sehen sind repräsentative Bilder der Immundetektion der Kinasen p38 und AKT sowie ihrer Phosphorylierung unter Sorafenib.

Die Western-Blot-Analysen bestätigten die Ergebnisse des Kinase Screen Arrays (Kapitel 3.4.2) und zeigten, dass schon geringe Konzentrationen an Sorafenib bei allen untersuchten Lymphomzelllinien zur Dephosphorylierung von p38 und AKT führten. Interessanterweise fand sich in der Western-Blot-Analyse für Karpas 422 ein größerer Effekt von Sorafenib auf die Dephosphorylierung von p38 als im Kinase Screen Array zu erkennen war.

3.5 Patientenproben

3.5.1 Zytotoxische Wirkung von Sorafenib auf Patientenproben

Nach den Erkenntnissen der vorangegangenen *in-vitro*-Untersuchungen sollte abschließend ein Bezug zur klinischen Relevanz der Ergebnisse überprüft werden. Hierfür standen viable Tumorzellsuspensionen von Patienten mit DLBCL, MCL und T-NHL zur Verfügung, die zu diagnostischen Zwecken gewonnen worden waren (vgl. Kapitel 2.5, S. 25).

Die Patientenproben wurden für 24 Stunden mit ansteigenden Sorafenibkonzentrationen inkubiert und anschließend mit einem MTT-Test auf Viabilitätsminderung untersucht (vgl. Kapitel 2.2.7.1, S. 17). Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Messwerte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunn-Posttest auf Signifikanz überprüft (vgl. Kapitel 2.4.2, S. 25).

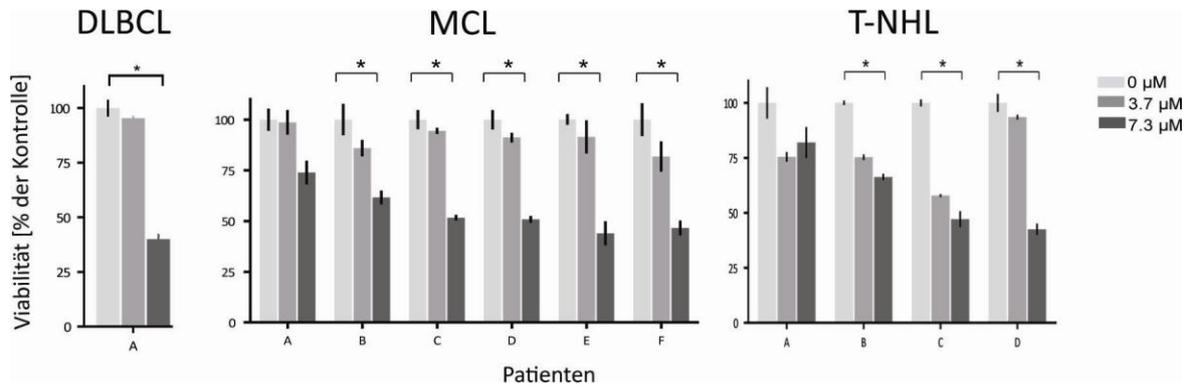


Abbildung 22: Zytotoxischer Effekt von Sorafenib auf Patientenproben unterschiedlicher Lymphomentitäten

Viable Tumorzellsuspensionen von elf verschiedenen Lymphompatienten wurden für 24 Stunden mit Sorafenib inkubiert. Dargestellt sind die Ergebnisse der anschließenden Viabilitätsuntersuchungen geordnet nach Lymphomentitäten. Signifikanzunterschiede von $p < 0,05$ sind mit * markiert.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten bei neun von elf Patienten eine signifikant geringere Viabilität der Tumorzellsuspensionen nach der Behandlung mit Sorafenib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Für alle untersuchten Lymphomentitäten konnte dieses Ergebnis mit klinisch erreichbaren Konzentrationen erzielt werden.

3.5.2 Überprüfung der Sorafenib-Zielstrukturen in Patientenproben

Die Versuche aus Kapitel 3.5.1 konnten zeigen, dass Sorafenib bei Primärmaterial einen durchaus vergleichbaren Effekt erzielt wie die *in-vitro*-Versuche zuvor. Es galt nun zu überprüfen, ob auch die gleichen Zielstrukturen von Sorafenib beeinflusst werden. Es wurden zunächst Patientenproben für zwei Stunden mit ansteigenden Sorafenibkonzentrationen inkubiert und anschließend mittels Western-Blot und Immundetektion der Phosphorylierungsgrad der Kinasen p38 und AKT untersucht (vgl. Kapitel 2.3, S. 20). Es handelte sich dabei um Proben derselben Patienten, die in Kapitel 3.5.1 untersucht worden waren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 zusammengestellt.

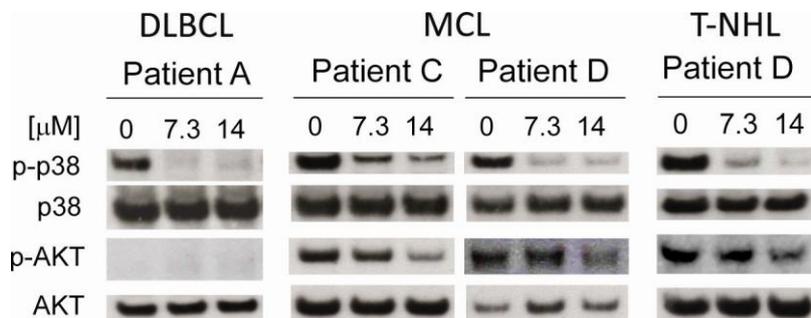


Abbildung 23: Western-Blot von Sorafenib-Zielstrukturen bei Primärmaterial

Primärmaterial von Lymphompatienten wurde zunächst mit ansteigenden Sorafenibkonzentrationen inkubiert und anschließend mittels Western-Blot und Immundetektion untersucht. Dargestellt sind die Bilder der Immundetektion geordnet nach Lymphomentitäten. Die Probenbezeichnung entspricht der Beschriftung aus Abbildung 22.

Die proteinbiochemische Untersuchung der Phosphorylierung von p38 und AKT bei Patientenproben nach vorheriger Sorafenibbehandlung zeigte, dass Sorafenib auch bei Primärmaterial vor allem die Phosphorylierung der zytosolischen Kinase p38 inhibierte.

4 Diskussion

4.1 Ausprägung molekularer Sorafenib-Zielstrukturen ausgewählter Lymphomentitäten

Als grundlegende und erste Frage dieser Arbeit galt es zu überprüfen, ob die für Sorafenib beschriebenen Zielstrukturen in humanen Lymphomen exprimiert werden (vgl. Kapitel 1.3, S. 4). WILHELM ET AL. (2004) hatten an der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 sowie an diversen Darm- und Lungenkrebszelllinien gezeigt, dass die wesentlichen Zielstrukturen für die Wirkung von Sorafenib bei diesen Tumorentitäten die Kinasen der Raf-Familie und die Rezeptor-tyrosinkinasen VEGF, PDGF, Flt3 und c-kit sind.

Mittels Western-Blot-Analysen und Durchflusszytometrie konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei allen untersuchten Lymphomentitäten mehrere der genannten Zielstrukturen exprimiert und aktiviert vorliegen (vgl. Kapitel 3.1, S. 26, Abbildung 4 bis Abbildung 6 sowie Tabelle 8). Vor allem für die Raf-Kinasen findet sich dabei eine große Übereinstimmung in ihrem Expressionsmuster. Den Raf-Kinasen wird eine zentrale Bedeutung in der Tumorentwicklung zugeschrieben, da sie in 30 % aller humanen Tumore überreguliert sind und somit zu den häufigsten tumorassoziierten Fehlregulationen gehören (HOSHINO ET AL. 1999; KOLCH ET AL. 2002).

Die Erkenntnisse der hier durchgeführten Untersuchungen legten daher eine Analyse der Sorafenibwirkung auf humane Non-Hodgkin-Lymphome nahe.

4.2 Zytostatische Effektivität von Sorafenib gegen humane Lymphome *in vitro*

Das nächste Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Sorafenib auf humane Lymphome *in vitro* zu untersuchen. Hierzu sollten unterschiedliche Aspekte einer putativen zytostatischen Wirkung von Sorafenib berücksichtigt werden.

Zunächst wurde mit einer Analyse der Stoffwechselaktivität unter Sorafenibexposition der Effekt auf die Viabilität der Lymphomzelllinien untersucht (vgl. Kapitel 3.2.1, S. 29). Es zeigte sich, dass bei allen Zelllinien der verschiedenen Lymphomentitäten eine signifikante Viabilitätsminderung durch Sorafenib in 24 Stunden erreicht werden konnte (vgl. Abbildung 7). Die daraus berechnete EC_{50} lag dabei mit Werten zwischen 4,3 μ M und 8,0 μ M für die unterschiedlichen Zelllinien in einem ähnlichen Bereich (vgl. Tabelle 9).

Es folgte eine weitere Analyse zur Klärung der Frage, ob die beobachtete Viabilitätsminderung durch Apoptose bedingt ist. Die in Kapitel 3.2.2 (S. 31) und 3.3.2 (S. 38) dargestellten Ergebnisse konnten deutlich zeigen, dass die Behandlung mit Sorafenib bei Non-Hodgkin-Lymphomen Apoptose induziert (vgl. Abbildung 8 und Abbildung 9 sowie Tabelle 10 und Tabelle 11). Des Weiteren zeigten diese Daten, dass die Wirkung von Sorafenib nicht nur dosis-

sondern auch zeitabhängig ist. Dabei wurden mit 7,3 μM Sorafenib bei den DLBCL und den Zelllinien Jurkat und Mino nach 48 und 72 Stunden Apoptoseraten von über 80 % erreicht. Dies war bei den BL nach zehn Tagen der Fall. Die Zelllinie Jeko wies zu diesem Zeitpunkt eine Apoptoserate von 39,7 % auf.

Der dritte Aspekt zur Analyse der zytostatischen Wirkung von Sorafenib auf humane Lymphome war die Untersuchung des Zellzyklus unter Sorafenibexposition (vgl. Kapitel 3.2.3, S. 33). Die Auswertung der Messdaten bestätigte sowohl die Dosis- und Zeitabhängigkeit der Sorafenibwirkung als auch die Erkenntnis, dass diese für alle untersuchten Lymphomentitäten Gültigkeit besitzt (vgl. Abbildung 10 bis Abbildung 12). Der Anteil an Zellen mit fragmentierter DNA (Sub G0) nahm bei allen Lymphomzelllinien außer CCRF-CEM deutlich zu und erreichte bei einer Sorafenibkonzentration von 7,3 μM nach 48 Stunden einen Anteil von über 40 % an allen gemessenen Zellen. Die Synthesephase sowie der Anteil der Zellen, die ihren DNA-Gehalt gerade verdoppelt hatten, waren hingegen deutlich reduziert. Bei CCRF-CEM zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der Sub G0-Fraktion. Sie betrug nach 48-stündiger Inkubation mit 7,3 μM Sorafenib 15 %. Im Gegensatz zu den übrigen Zelllinien, bei denen der Zellzyklus mit zunehmender Zeit und ansteigender Dosis fast vollständig aufgehoben war, war bei CCRF-CEM - trotz Zunahme der Sub G0-Fraktion - der Zellzyklus in seiner typischen Form erhalten geblieben (vgl. Abbildung 10).

Diese Beobachtungen führten zu der Frage nach dem Wachstumsverhalten von Lymphomzelllinien unter kontinuierlicher Sorafenibexposition sowie weiterführend nach der Reversibilität der Sorafenibwirkung. Die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.1 (S. 36) konnten zeigen, dass die kontinuierliche Exposition mit Sorafenib über einen Zeitraum von zehn Tagen auch schon bei geringeren Konzentrationen von nur 3,7 μM Sorafenib das Zellwachstum hemmte und somit antiproliferative Wirkung erzielte (vgl. Abbildung 13 und Abbildung 14). Außerdem konnte gezeigt werden, dass nach vorrausgegangener Behandlung mit 7,3 μM Sorafenib auch unter anschließend Sorafenib-freien Bedingungen kein Wiedereintritt in die Wachstumsphase möglich war (vgl. Kapitel 3.3.3, S. 38 und Abbildung 15). Wie Tabelle 12 zu entnehmen ist, ließ sich dieses Ergebnis bei allen untersuchten Zelllinien beobachten. Auch hierbei konnte der Aspekt der Dosisabhängigkeit bestätigt werden. Bereits eine Inkubation mit 0,7 μM Sorafenib über zehn Tage bewirkte eine deutliche, wachstumshemmende Wirkung und einen Rückgang der Klonogenität im nachfolgenden Auslassversuch (vgl. Tabelle 13).

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass die viabilitätsmindernde und antiproliferative Wirkung von Sorafenib auf Lymphomzelllinien mit klinisch darstellbaren Konzentrationen und kontinuierlicher Exposition erzielt werden konnte und dass Konzentrationen von 7,3 μM Sorafenib nach 24 Stunden Apoptoseinduktion bewirkten. Die antiproliferative und proapoptotische Wirkung von Sorafenib war hierbei irreversibel dosis- und zeitabhängig.

Die vorliegende Arbeit kommt damit zu dem Ergebnis, dass Sorafenib eine zytostatische Wirkung auf humane Non-Hodgkin-Lymphome hat.

Die Erkenntnisse zur zytostatischen Effektivität von Sorafenib befinden sich in Übereinstimmung sowohl mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zu soliden Tumoren (WILHELM ET AL. 2004; WILHELM ET AL. 2008) als auch mit Ergebnissen zu nicht-soliden Tumoren (ZHANG ET AL. 2008; NGUYEN ET AL. 2010). ZHANG ET AL. (2008) beobachteten bei *in-vitro*-Untersuchungen zur AML einen apoptoseinduzierenden Effekt bei 72-stündiger Inkubation mit 5 μ M Sorafenib. Jüngste Ergebnisse von NGUYEN ET AL. (2010) bestätigen die Apoptoseinduktion sogar bei DLBCL, Burkitt- und Hodgkin-Lymphomen. Hierbei verwendeten sie Sorafenibkonzentrationen zwischen 3 und 10 μ M und erreichten bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden ebenfalls Apoptoseraten von über 50 % (NGUYEN ET AL. 2010).

4.3 Molekulare Wirkung von Sorafenib bei humanen Non-Hodgkin-Lymphomen

Eine weitere Frage dieser Arbeit war die Überprüfung der molekularen Wirkung von Sorafenib bei humanen Non-Hodgkin-Lymphomen. Die große Übereinstimmung im Expressionsmuster der Raf-Kinasen bei den untersuchten Lymphomentitäten (vgl. Abbildung 4 und Kapitel 4.1) und die von anderen Arbeitsgruppen bereits belegte zentrale Bedeutung der Raf-Kinasen in der Signaltransduktion und Tumorentstehung (KASID ET AL. 1989; HOSHINO ET AL. 1999; KOLCH ET AL. 2002; WILHELM ET AL. 2004) legten es nahe, zunächst die Phosphorylierung der Raf-Kinasen unter Sorafenibexposition zu überprüfen.

Es zeigte sich hierbei, dass der beschriebene zytostatische Effekt von Sorafenib bei humanen Non-Hodgkin-Lymphomen nicht über eine Inhibierung der Raf-Kinasen vermittelt wird (vgl. Abbildung 4). Mithilfe eines orientierenden Kinase Screen Arrays konnten anschließend jedoch die intrazellulären Kinasen Akt und p38 identifiziert werden, die einheitlich bei allen hiermit untersuchten Lymphomzelllinien eine besonders starke Dephosphorylierung unter Sorafenibexposition aufwiesen (vgl. Abbildung 17 bis Abbildung 20). Western-Blot-Analysen konnten diese Ergebnisse bestätigen und eine Dosisabhängigkeit des Effekts zeigen (vgl. Abbildung 21).

Die ausschlaggebende Rolle des Akt-Signalweges liegt in dessen vielfältiger antiapoptotischen Funktion, die bereits zuvor für eine Vielzahl lymphoider Malignitäten beschrieben worden ist (DATTA ET AL. 1999; FILLMORE ET AL. 2005). WENDEL ET AL. konnten 2004 in einem murinen Lymphommodell zeigen, dass die Aktivierung von Akt die Tumorentstehung und die Entwicklung von Medikamentenresistenz durch Unterbrechung der zelleigenen Apoptosemechanismen fördert. Wie auch bei anderen Malignitäten konnte für DLBCL-Zelllinien und 52 % eines Kollektivs aus primären DLBCL-Proben gezeigt werden, dass der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) / Akt-Signalweg konstitutiv aktiviert ist (UDDIN ET AL. 2005; UDDIN ET AL.

2006; BAOHUA ET AL. 2008). Hinzu kommen die Erkenntnisse, dass die Inhibierung von Kinasen, die PI3K / Akt vorgeschaltet sind, ausreicht, um bei Akt-abhängigen Zelllinien Apoptose zu induzieren und dass dementsprechend die Aktivierung von Akt - vermittelt durch das Hitzeschockprotein HSP90 - entscheidend für das Überleben dieser Zelllinien ist (UDDIN ET AL. 2006; GEORGAKIS ET AL. 2006; ABRAMSON ET AL. 2009). Jedoch sind bei Lymphomen, im Gegensatz zu anderen Malignitäten, bisher keine aktivierenden Mutationen der PI3K beschrieben worden, sodass der Mechanismus der beobachteten Aktivierung des Akt-Signalweges zunächst ungeklärt bleibt (BAOHUA ET AL. 2008). SRINIVASAN ET AL. betonten 2009 die Bedeutung von PI3K bei B-Zellen indem sie zeigten, dass bei reifen B-Zellen mit einem BCR-Defekt die alleinige Signalkompensation über PI3K / Akt zum Überleben der Zellen ausreicht. Bei nicht-lymphoiden Malignitäten, bei denen eine Inhibition des Akt-Signalweges in Abhängigkeit von Sorafenib gezeigt werden konnte, wird diesbezüglich eine Interaktion zwischen dem Ras- und dem Akt-Signalweg diskutiert (YANG ET AL. 2008; ZHANG ET AL. 2008).

Die ausschlaggebende Rolle der Kinase p38, die zu den mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) gehört, liegt in der Hemmung der Zellproliferation und der Induktion von Apoptose bei verschiedenen Stresssignalen der Zelle (HUI ET AL. 2007). Fehlregulation des p38 MAPK-Signalweges aufgrund von Fehlfunktion oder Überexpression von zugehörigen Regulatoren fördert durch den Verlust der Apoptoseinduktion die Tumorentstehung. Dies konnte bei mehreren humanen Tumoren und Tumorzelllinien beobachtet werden (WAGNER und NEBRADA 2009). ELENITOBA-JOHNSON ET AL. (2003) haben gezeigt, dass die Transformation von indolenten follikulären B-Zell-Lymphomen zu aggressiven Lymphomen mit einer Aktivierung von p38 MAPK assoziiert ist. Während bei follikulären Lymphomen in niedrigen Stadien und nicht-transformierten Zellen keine oder nur eine geringe Aktivität von p38 MAPK festgestellt werden konnte, war die Phosphorylierung bei DLBCL und transformierten Zellen sehr stark. Eine spezifische Inhibierung von p38 MAPK durch SB203580 induzierte bei der DLBCL-Zelllinie SU-DHL-4 Apoptose und hatte bei einem Xenotransplantatmodell zytostatische Wirkung (ELENITOBA-JOHNSON ET AL. 2003; LIN ET AL. 2004). Weiterführende Versuche von KUROSU ET AL. (2005) an B-Zell-Lymphomen konnten zeigen, dass das Zytostatikum Etoposid als Stressstimulator zur Phosphorylierung von p38 MAPK führt und dass die zusätzliche pharmakologische oder genetische Inhibierung des p38 MAPK-Signalweges den apoptotischen Effekt von Etoposid verstärkt. Auch der zytostatische Effekt von Doxorubicin und Cisplatin konnte bei p53-abhängigen Tumorenmodellen durch die spezifische Inhibierung von MK2, einem der Hauptsubstrate des p38 MAPK-Signalweges, verstärkt werden (REINHARDT ET AL. 2007). Für EBV-assoziierte Lymphome ließ sich an der Zelllinie Raji zeigen, dass die p38 MAPK-Inhibierung nicht nur Apoptose induziert, sondern auch die Virusreplikation hemmt (MATUSALI ET AL. 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen im Zusammenhang mit den Erkenntnissen zur Funktion und Bedeutung des Akt- und p38 MAPK-Signalweges den Schluss zu, dass die hier gezeigte

zytostatische Wirkung von Sorafenib auf Lymphomzelllinien maßgeblich durch die Inhibierung von p38 und Akt vermittelt wird. Im Weiteren führt die in allen untersuchten Zelllinien beobachtete deutliche Dephosphorylierung der Kinase p38 unter Sorafenibexposition zu der Annahme, dass es einen einheitlichen Wirkmechanismus von Sorafenib auf Non-Hodgkin-Lymphome gibt und dass im Umkehrschluss der Phosphorylierungsstatus von p38 eine Aussage auf die Wirksamkeit von Sorafenib bei Lymphomen zulässt.

4.4 Ausblick auf die Möglichkeiten der klinischen Anwendung

Die abschließende Frage dieser Arbeit galt dem Ausblick auf die Möglichkeiten der klinischen Anwendung von Sorafenib bei humanen Non-Hodgkin-Lymphomen. Anhand von primärem Lymphommaterial aus Patientenproben (vgl. Kapitel 2.5, S. 25) sollte untersucht werden, ob die *in vitro* beobachteten Ergebnisse zum zytostatischen Effekt von Sorafenib auf Lymphomzelllinien auch bei Primärmaterial Gültigkeit haben.

Es zeigte sich hierbei sowohl in den Viabilitätsuntersuchungen (vgl. Kapitel 3.5.1, S. 45) als auch in den Western-Blot-Analysen (vgl. Kapitel 3.5.2, S. 46), dass Sorafenib auch bei den Patientenproben bereits nach 24 Stunden signifikant zytostatisch wirkt und dass p38 und Akt inhibiert werden. Mit 7,3 μM Sorafenib wurde bei Patientenproben aller Entitäten eine Viabilitätsminderung von über 50 % erreicht (vgl. Abbildung 22). Die Inhibierung von p38 und Akt konnte für alle Entitäten, bei denen der jeweilige Signalweg aktiviert war, bestätigt werden (vgl. Abbildung 23). Bei einer DLBCL-Patientenprobe war keine p-Akt-Aktivität festzustellen. Diese Beobachtung lässt sich aber vor dem Hintergrund der Untersuchungen von UDDIN ET AL. (2006) verstehen, die lediglich für 52 % der getesteten DLBCL-Tumoren eine Aktivierung von p-Akt beschreiben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass Sorafenib *in vitro* eine signifikant zytostatische Wirkung auf aggressive Non-Hodgkin-Lymphome der B- und T-Zellreihe besitzt. Sowohl die Wirkung an sich als auch der Wirkmechanismus über die Inhibierung entscheidender Tyrosinkinase-vermittelter Zellsignalwege konnten einheitlich für alle untersuchten Lymphomentitäten bei primärem Lymphommaterial bestätigt werden. Die hierfür notwendige Sorafenibdosis liegt dabei deutlich unter der klinisch erreichbaren und verhältnismäßig gut verträglichen Plasmakonzentration von 15 μM (STRUMBERG ET AL. 2005). Die zielgerichtete Tyrosinkinaseinhibition ist ein rationaler Therapieansatz zur Lymphomtherapie, der für B-Zell-Lymphome mit intaktem BCR-Signalweg bereits klinisch erprobt wird (CHEN ET AL. 2008; FRIEDBERG ET AL. 2009; DAVIS ET AL. 2010).

Sorafenib als oral zu applizierender Multikinaseinhibitor stellt vor allem für die Kombinationstherapie einen attraktiven Partner in der Lymphombehandlung dar. Mit der Inhibierung des p38 MAPK-Signalweges und des Akt-Signalweges wird zusätzlich zur eigenen zytostati-

schen und antiproliferativen Wirkung eine Verstärkung des apoptotischen Effektes anderer Zytostatika vermittelt. Dies konnte bereits für Lymphome und andere Malignitäten in der Kombination von Sorafenib mit Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin, Cytarabin und Bortezomib gezeigt werden (KUROSU ET AL. 2005; REINHARDT ET AL. 2007; YU ET AL. 2006; ZHANG ET AL. 2008). Besonders interessant ist auch die Kombination mit dem anti-CD20 Antikörper Rituximab, dem zentralen Bestandteil der aktuellen Standardtherapie bei B-Zell-Malignitäten, für den bereits eine apoptoseinduzierende Wirkung bei der chronischen lymphatischen Leukämie der B-Zellreihe (B-CLL) über den p38 MAPK-Signalweg beschrieben worden ist (PEDERSEN ET AL. 2002).

Ein weiterer Aspekt sind die extrazellulären Effekte von Sorafenib in der klinischen Anwendung. Während die Ergebnisse dieser Arbeit die intrazelluläre Wirkung von Sorafenib auf die Lymphomviabilität und Zellsignalwege beleuchten, kann *in vivo* ein weiterer tumorinhibierender Effekt durch die beschriebene anti-angioproliferative Wirkung von Sorafenib auf das den Tumor umgebende Mikromilieu erreicht werden (WILHELM ET AL. 2004). Die simultane Inhibierung von intrazellulären Signalkaskaden und extrazellulärer Angiogenese kann sich als effektive Strategie in der Behandlung von aggressiven Lymphomen herausstellen. Sorafenib sollte vor diesem Hintergrund und bei der in dieser Arbeit *in vitro* dargestellten signifikanten Wirksamkeit gegen aggressive B- und T-Zell-Lymphome als sinnvolle Ergänzung der aktuellen Lymphomtherapie *in vivo* getestet werden.

5 Zusammenfassung

Ein Großteil der Patienten mit aggressiven Lymphomen kann heute durch den Einsatz einer zytostatischen Therapie von der Erkrankung geheilt werden. Für Patienten mit peripheren T-Zell-Lymphomen oder Patienten mit rezidierten Lymphomen stehen allerdings meist keine Therapieoptionen mit kurativem Potential zur Verfügung. Kinase-vermittelte intrazelluläre Signalübermittlung ist entscheidend für das Überleben von Lymphomzellen, wobei bisher in der Pathogenese der malignen Lymphome in der Regel mehrere, z.T. überlappende Signalt-ransduktionswege als aktiviert beschrieben wurden. In dieser Arbeit wurde daher die zytostatische Wirkung eines mehrere Kinasen inhibierenden Moleküls, Sorafenib, bei verschiedenen aggressiven Lymphomen umfassend *in vitro* analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass Sorafenib die Viabilität bereits bei geringen Konzentrationen in Abhängigkeit von Dosis und Zeit signifikant reduzierte. Kurzzeitexposition bewirkte eine Apoptoseinduktion, während Langzeitexposition in geringen Konzentrationen vornehmlich einen proliferativen Arrest induzierte. Diese antiproliferative Wirkung war irreversibel, wie anschließende Klonogenitätsversuche zeigen konnten. Die klassischen Zielstrukturen von Sorafenib, insbesondere die Raf-Kinasen, waren bei den untersuchten Lymphomentitäten zwar konstitutiv aktiviert, wurden aber uneinheitlich durch Sorafenibexposition inhibiert. Mit Hilfe eines globalen Kinase-Arrays wurden die MAP-Kinase p38 und Akt als Zielstrukturen von Sorafenib bei Lymphomen identifiziert. Diese Erkenntnisse zur Wirkung von Sorafenib auf Lymphomzelllinien besaßen auch Gültigkeit für primäres Lymphommaterial, wie anhand von Patientenproben gezeigt werden konnte. Die für diese Effekte notwendigen Sorafenibkonzentrationen lagen dabei deutlich unterhalb der im Plasma von Patienten in bisherigen Studien erreichten, klinisch tolerablen Plasmakonzentrationen. Die zentrale Bedeutung von MAPK p38 und Akt sowie die umfangreichen Erfahrungen mit dem Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib bei anderen Entitäten maligner Erkrankungen machen Sorafenib mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu einer rationalen Ergänzung der aktuellen Therapie aggressiver Lymphome, die es in weiteren klinischen Untersuchungen zu überprüfen gilt.

6 Literaturverzeichnis

- Abramson JS, Chen W, Juszczynski P, Takahashi H, Neuberg D, Kutok JL, Takeyama K, Shipp MA (2009): The heat shock protein 90 inhibitor IPI-504 induces apoptosis of AKT-dependent diffuse large B-cell lymphomas. *Br J Haematol* 144(3): 358-366.
- Anon. (1997): A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 89(11): 3909-3918.
- Armitage JO, Weisenburger DD (1998): New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 16(8): 2780-2795.
- Baohua Y, Xiaoyan Z, Tiecheng Z, Tao Q, Daren S (2008): Mutations of the PIK3CA gene in diffuse large B cell lymphoma. *Diagn Mol Pathol* 17(3): 159-165.
- Bishop JM (1983): Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu Rev Biochem* 52: 301-354.
- Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, Tassies D, Jaffe ES, Montserrat E, Rozman C, et al. (1994): PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 84(8): 2726-2732.
- Burkitt D (1958): A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* 46(197): 218-223.
- Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr. (1974): Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 53(3): 661-674.
- Campo E, Raffeld M, Jaffe ES (1999): Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol* 36(2): 115-127.
- Chen L, Monti S, Juszczynski P, Daley J, Chen W, Witzig TE, Habermann TM, Kutok JL, Shipp MA (2008): SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 111(4): 2230-2237.
- Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB, Pawson T (1995): Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 378(6554): 303-306.

- Coiffier B (2007): Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* 26(25): 3603-3613.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999): Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13(22): 2905-2927.
- Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, Kohlhammer H, Lamy L, Zhao H, Yang Y, et al. (2010): Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 463(7277): 88-92.
- Deininger MW, Vieira S, Mendiola R, Schultheis B, Goldman JM, Melo JV (2000): BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 60(7): 2049-2055.
- Denizot F, Lang R (1986): Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89(2): 271-277.
- de Vries MJ, Veerman AJ, Zwaan CM (2004): Rituximab in three children with relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukaemia/Burkitt non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 125(3): 414-415.
- Druker BJ, Lydon NB (2000): Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 105(1): 3-7.
- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, et al. (2006): Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 355(23): 2408-2417.
- Dyer MJ, Fischer P, Nacheva E, Labastide W, Karpas A (1990): A new human B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell line (Karpas 422) exhibiting both t (14;18) and t(4;11) chromosomal translocations. *Blood* 75(3): 709-714.
- Elenitoba-Johnson KS, Jenson SD, Abbott RT, Palais RA, Bohling SD, Lin Z, Tripp S, Shami PJ, Wang LY, Coupland RW, et al. (2003): Involvement of multiple signaling pathways in follicular lymphoma transformation: p38-mitogen-activated protein kinase as a target for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12): 7259-7264.

- Epstein AL, Herman MM, Kim H, Dorfman RF, Kaplan HS (1976): Biology of the human malignant lymphomas. III. Intracranial heterotransplantation in the nude, athymic mouse. *Cancer* 37(5): 2158-2176.
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, et al. (2007): Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356(2): 125-134.
- Fillmore GC, Wang Q, Carey MJ, Kim CH, Elenitoba-Johnson KS, Lim MS (2005): Expression of Akt (protein kinase B) and its isoforms in malignant lymphomas. *Leuk Lymphoma* 46(12): 1765-1773.
- Foley GE, Lazarus H, Farber S, Uzman BG, Boone BA, McCarthy RE (1965): Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* 18: 522-529.
- Fried J, Perez AG, Clarkson BD (1978): Rapid hypotonic method for flow cytofluorometry of monolayer cell cultures. Some pitfalls in staining and data analysis. *J Histochem Cytochem* 26(11): 921-933.
- Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, Johnston PB, Vose JM, Lacasce A, Schaefer-Cuttillo J, De Vos S, Sinha R, Leonard JP, et al. (2010): Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in Non-Hodgkin-Lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115(13): 2578-2585.
- Gauld SB, Dal Porto JM, Cambier JC (2002): B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease. *Science* 296(5573): 1641-1642.
- Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, Andersen NS, Pedersen LB, Jerkeman M, Eriksson M, Nordstrom M, Kimby E, Boesen AM, et al. (2008): Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group. *Blood* 112(7): 2687-2693.
- Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Mills GB, Younes A (2006): Inhibition of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 132(4): 503-511.

- Goldberg JM, Silverman LB, Levy DE, Dalton VK, Gelber RD, Lehmann L, Cohen HJ, Sallan SE, Asselin BL (2003): Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. *J Clin Oncol* 21(19): 3616-3622.
- Harif M, Barsaoui S, Benchekroun S, Boccon-Gibod L, Bouhas R, Doumbe P, El Haffaf Z, Khattab M, Ladjadj Y, Mallon B, et al. (2005): Treatment of childhood cancer in Africa. Preliminary results of the French-African paediatric oncology group]. *Arch Pediatr* 12(6): 851-853.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, et al. (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84(5): 1361-1392.
- Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M (2007): Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 370(9584): 342-350.
- Hiddemann W, Longo DL, Coiffier B, Fisher RI, Cabanillas F, Cavalli F, Nadler LM, De Vita VT, Lister TA, Armitage JO (1996): Lymphoma classification: the gap between biology and clinical management is closing. *Blood* 88(11): 4085-4089.
- Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, et al. (1999): Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18(3): 813-822.
- Hui L, Bakiri L, Stepniak E, Wagner EF (2007): p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle* 6(20): 2429-2433.
- Jadayel DM, Lukas J, Nacheva E, Bartkova J, Stranks G, De Schouwer PJ, Lens D, Bartek J, Dyer MJ, Kruger AR, et al. (1997): Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta 519). *Leukemia* 11(1): 64-72.
- Jeon HJ, Kim CW, Yoshino T, Akagi T (1998): Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line. *Br J Haematol* 102(5): 1323-1326.
- Kantarjian HM, Giles F, Quintas-Cardama A, Cortes J (2007): Important therapeutic targets in chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 13(4): 1089-1097.

- Kasid U, Pfeifer A, Brennan T, Beckett M, Weichselbaum RR, Dritschilo A, Mark GE (1989): Effect of antisense c-raf-1 on tumorigenicity and radiation sensitivity of a human squamous carcinoma. *Science* 243(4896): 1354-1356.
- Klein G, Giovanella B, Westman A, Stehlin JS, Mumford D (1975): An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology* 5(6): 319-334.
- Kolch W, Kotwaliwale A, Vass K, Janosch P (2002): The role of Raf kinases in malignant transformation. *Expert Rev Mol Med* 4(8): 1-18.
- Kurosaki T (1998): Molecular dissection of B cell antigen receptor signaling (review). *Int J Mol Med* 1(3): 515-527.
- Kurosu T, Takahashi Y, Fukuda T, Koyama T, Miki T, Miura O (2005): p38 MAP kinase plays a role in G2 checkpoint activation and inhibits apoptosis of human B cell lymphoma cells treated with etoposide. *Apoptosis* 10(5): 1111-1120.
- Lai R, McDonnell TJ, O'Connor SL, Medeiros LJ, Oudat R, Keating M, Morgan MB, Curiel TJ, Ford RJ (2002): Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line, Mino. *Leuk Res* 26(9): 849-855.
- Lenz G, Staudt LM (2010): Aggressive lymphomas. *N Engl J Med* 362(15): 1417-1429.
- Lin Z, Crockett DK, Jenson SD, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS (2004): Quantitative proteomic and transcriptional analysis of the response to the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 in transformed follicular lymphoma cells. *Mol Cell Proteomics* 3(8): 820-833.
- Lok MS, Koshiba H, Han T, Abe S, Minowada J, Sandberg AA (1979): Establishment and characterization of human B-lymphocytic lymphoma cell lines (BALM-3, -4 and -5); intracloonal variation in the B-cell differentiation stage. *Int J Cancer* 24(5): 572-578.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265-275.

- Matusali G, Arena G, De Leo A, Di Renzo L, Mattia E (2009): Inhibition of p38 MAP kinase pathway induces apoptosis and prevents Epstein Barr virus reactivation in Raji cells exposed to lytic cycle inducing compounds. *Mol Cancer* 8: 18.
- Minowada J, Onuma T, Moore GE (1972): Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Natl Cancer Inst* 49(3): 891-895.
- Monroe JG (2006): ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol* 6(4): 283-294.
- Morel P, Lepage E, Brice P, Dupriez B, D'Agay MF, Fenaux P, Gosselin B, Bauters F, Gisselbrecht C (1992): Prognosis and treatment of lymphoblastic lymphoma in adults: a report on 80 patients. *J Clin Oncol* 10(7): 1078-1085.
- Nguyen TK, Jordan N, Friedberg J, Fisher RI, Dent P, Grant S (2010): Inhibition of MEK/ERK1/2 sensitizes lymphoma cells to sorafenib-induced apoptosis. *Leuk Res* 34(3): 379-386.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991): A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139(2): 271-279.
- Patte C, Auperin A, Gerrard M, Michon J, Pinkerton R, Sposto R, Weston C, Raphael M, Perkins SL, McCarthy K, et al. (2007): Results of the randomized international FAB/LMB96 trial for intermediate risk B-cell Non-Hodgkin-Lymphoma in children and adolescents: it is possible to reduce treatment for the early responding patients. *Blood* 109(7): 2773-2780.
- Pedersen IM, Buhl AM, Klausen P, Geisler CH, Jurlander J (2002): The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood* 99(4): 1314-1319.
- Peterson GL (1979): Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* 100(2): 201-220.
- Pulvertaft JV (1964): Cytology of Burkitt's Tumor (African Lymphoma). *Lancet* 1964, 1: 238-240.

- Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA, Yaffe MB (2007): p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* 11(2): 175-189.
- Salaverria I, Perez-Galan P, Colomer D, Campo E (2006): Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Haematologica* 91(1): 11-16.
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G (1977): Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed Non-Hodgkin-Lymphoma. *Int J Cancer* 19(5): 621-626.
- Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, Klasa R, Savage KJ, Shenkier T, Sutherland J, et al. (2007): The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 109(5): 1857-1861.
- Soussain C, Patte C, Ostronoff M, Delmer A, Rigal-Huguet F, Cambier N, Leprise PY, Francois S, Cony-Makhoul P, Harousseau JL, et al. (1995): Small noncleaved cell lymphoma and leukemia in adults. A retrospective study of 65 adults treated with the LMB pediatric protocols. *Blood* 85(3): 664-674.
- Srinivasan L, Sasaki Y, Calado DP, Zhang B, Paik JH, DePinho RA, Kutok JL, Kearney JF, Otipoby KL, Rajewsky K (2009): PI3 Kinase Signals BCR-Dependent Mature B Cell Survival. *Cell* 139(3): 573-586.
- Strumberg D, Richly H, Hilger RA, Schleucher N, Korfee S, Tewes M, Faghih M, Brendel E, Voliotis D, Haase CG, et al. (2005): Phase I clinical and pharmacokinetic study of the Novel Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43-9006 in patients with advanced refractory solid tumors. *J Clin Oncol* 23(5): 965-972.
- Strumberg D, Awada A, Hirte H, Clark JW, Seeber S, Piccart P, Hofstra E, Voliotis D, Christensen O, Brueckner A, et al. (2006): Pooled safety analysis of BAY 43-9006 (sorafenib) monotherapy in patients with advanced solid tumours: Is rash associated with treatment outcome? *Eur J Cancer* 42(4): 548-556.
- Swerdlow SH, Williams ME (2002): From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades. *Hum Pathol* 33(1): 7-20.

- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW: WHO Classification of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (WHO Classification of Tumours, Volume 2), Fourth Edition. *WHO Press, Geneva 2008*.
- Thomas DA, Faderl S, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Cortes J, Garcia-Manero G, Giles FJ, Verstovsek S, Wierda WG, Pierce SA, et al. (2006): Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 106(7): 1569-1580.
- Tort F, Camacho E, Bosch F, Harris NL, Montserrat E, Campo E (2004): Familial lymphoid neoplasms in patients with mantle cell lymphoma. *Haematologica* 89(3): 314-319.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Uddin S, Hussain AR, Al-Hussein KA, Manogaran PS, Wickrema A, Gutierrez MI, Bhatia KG (2005): Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling promotes apoptosis of primary effusion lymphoma cells. *Clin Cancer Res* 11(8): 3102-3108.
- Uddin S, Hussain AR, Siraj AK, Manogaran PS, Al-Jomah NA, Moorji A, Atizado V, Al-Dayel F, Belgaumi A, El-Solh H, et al. (2006): Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival. *Blood* 108(13): 4178-4186.
- Ullrich A, Schlessinger J (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61(2): 203-212.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184(1): 39-51.
- Wagner EF, Nebreda AR (2009): Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9(8): 537-549.
- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, et al. (2004): Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116(6): 855-867.

- Watson JV, Chambers SH, Smith PJ (1987): A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry* 8(1): 1-8.
- Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, Malina A, Ray S, Kogan S, Cordon-Cardo C, Pelletier J, Lowe SW (2004): Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* 428(6980): 332-337.
- Wilhelm S, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, et al. (2004): BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 64(19): 7099-7109.
- Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S (2006): Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5(10): 835-844.
- Wilhelm S, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M (2008): Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 7(10): 3129-3140.
- Yang F, Van Meter TE, Buettner R, Hedvat M, Liang W, Kowolik CM, Mepani N, Mirosevich J, Nam S, Chen MY, et al. (2008): Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription 3 signaling associated with growth arrest and apoptosis of medulloblastomas. *Mol Cancer Ther* 7(11): 3519-3526.
- Yu C, Friday BB, Lai JP, Yang L, Sarkaria J, Kay NE, Carter CA, Roberts LR, Kaufmann SH, Adjei AA (2006): Cytotoxic synergy between the multikinase inhibitor sorafenib and the proteasome inhibitor bortezomib in vitro: induction of apoptosis through Akt and c-Jun NH2-terminal kinase pathways. *Mol Cancer Ther* 5(9): 2378-2387.
- Zhang W, Konopleva M, Ruvolo VR, McQueen T, Evans RL, Bornmann WG, McCubrey J, Cortes J, Andreeff M (2008): Sorafenib induces apoptosis of AML cells via Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Leukemia* 22(4): 808-818.

7 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit sind bereits an folgenden Stellen veröffentlicht worden:

Schuelper N, Kähler E, Chapuy B, Trümper L, Wulf G (2008): Preclinical evaluation of multikinase inhibition by sorafenib in B and T NHL. *Onkologie* 31(suppl 4): 8.

Chapuy B, Schuelper N, Kähler E, Trümper L, Wulf G (2008): Multikinase Inhibition by Sorafenib in B and T NHL Cell Lines: Increasing Cytostatic Efficacy after Prolonged Exposure. *Blood* 112(11): 4980.

Schuelper N, Chapuy B, Panse M, Trümper L, Wulf G (2009): Cytostatic effects of Sorafenib in B and T NHL cell lines involves PI3K/AKT and p38 MAPK pathways. *Onkologie* 32(suppl 4): 193.