



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik für Hämatologie und Internistische Onkologie
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Prof. Dr. Florian Bassermann)

Effektive Induktion von Apoptose in den Knochenmarkszellen von Patienten mit
Myelodysplastischen Syndromen (MDS) der Hochrisikogruppe oder mit sekundärer
Leukämie aus MDS durch das BH3-Mimetikum ABT-737

Justus König

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der medizinischen Wissenschaft
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: apl. Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Philipp Jakob Jost
2. Prof. Dr. Jürgen Ruland

Die Dissertation wurde am 12.09.2018 bei der Technischen Universität eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 12.12.2018 angenommen.

FÜR DR. MECHTILD KÖNIG

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	8
1.1 DIE MYELOYDYSPLASTISCHEN SYNDROME	8
1.1.1 DEFINITION UND EPIDEMIOLOGIE	8
1.1.2 DEREGULIERTE APOPTOSE IN ABHÄNGIGKEIT DER VERSCHIEDENEN RISIKOGRUPPEN.....	8
1.1.3 KLINIK	9
1.1.4 THERAPIE	9
1.2 APOPTOSE	10
1.2.1 DER REGULIERTE ZELLTOD	11
1.2.2 APOPTOSERESISTENZ ALS MALIGNITÄTSKRITERIUM.....	12
1.2.3 PATHOMECHANISMEN DES MDS.....	13
1.2.4 APOPTOSE-SIGNALWEGE	14
1.2.4.1 DER EXTRINSISCHE APOPTOSE-SIGNALWEG.....	14
1.2.4.2 DER INTRINSISCHE APOPTOSE-SIGNALWEG	15
1.3 DAS BH3-MIMETIKUM ABT-737 UND DER SELEKTIVE BCL-2-INHIBITOR ABT-199 ALS POTENTE MODIFIKATOREN DES INTRINSISCHEN APOPTOSE-SIGNALWEGS	16
1.4 BEDEUTUNG DER HÄMATOPOETISCHEN NISCHE IM MDS	17
1.5 PROBLEMSTELLUNG.....	18
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 VERARBEITUNG HUMANER PROBEN	19
2.1.1 ALTERSKORRELIERTE GESUNDE KONTROLLE AUS HÜFTKÖPFEN.....	19
2.1.2 MDS-ZELLEN AUS KNOCHENMARKSPUNKTIONSMATERIAL.....	19
2.1.3 PROBENART-UNABHÄNGIGE WEITERVERARBEITUNG	20
2.1.4 ZELLZAHL-ABHÄNGIGE VERSUCHSGESTALTUNG.....	20
2.1.5 ZELLKULTUR	21
2.1.6 STROMAZELL-CO-KULTUR	23
2.1.7 COLONY FORMATION ASSAY	23
2.2 STATISTIK UND DARSTELLUNG	25
2.3 KLASSEIFIKATION DER RISIKOGRUPPEN DES MDS	25
3 ERGEBNISSE	27
3. RISIKOGRUPPEN-ABHÄNGIGE APOPTOSEINDUKTION IN VORLÄUFERZELLEN DES KNOCHENMARKS	27
3.1 ABT-737 ZEIGT KEINE ZYTOTOXISCHEN EFFEKTE AUF DIE GESUNDE VORLÄUFERZELLE.....	29
3.2 EFFEKTIVE APOPTOSEINDUKTION IM HOCHRISIKO-MDS UND SAML BEI FEHLENDER APOPTOSEINDUKTION IM MDS NIEDRIGEN UND INTERMEDIÄREN RISIKOPROFILS	30
3.3 AUSWIRKUNG VON ABT-737 AUF APOPTOSERESISTENZ VON MDS-VORLÄUFERZELLEN.....	31
3.4 EINFLUSS VON ABT-737 AUF APOPTOSE KOLONIE-BILDENDER VORLÄUFERZELLEN.....	35
3.5 EFFEKT DER STROMAPROTEKTION AUF DIE APOPTOSEINDUKTION DURCH ABT-737	37
4 DISKUSSION	39
4.1 „HOCHRISIKO“ ALS PRÄDIKTOR FÜR THERAPIEANSPRECHEN DES BH3-MIMETIKUMS ABT-737.....	39
4.2 DIE MDS-VORLÄUFERZELLE UND DEREN BEEINFLUSSBARKEIT DURCH ABT-737.....	39
4.3 KLINISCHE TRANSITION DER ZELLKULTURERGEBNISSE.....	40
4.4 MCL-1 ALS HAUPTRESISTENZFAKTOR EINER AUF BCL-2 ZIELGERICHTETEN THERAPIE	40
4.5 MITOCHONDRIALES PRIMING	41

INHALTSVERZEICHNIS

<u>5 ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>42</u>
<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>43</u>
<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>54</u>
<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>55</u>
<u>DANKSAGUNG</u>	<u>57</u>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7AAD	7-Aminoactinomycin D
Abb.	Abbildung
ABT	Abbott laboratories
ADCD	Autophagy-dependent cell death
AdLux-F	Adenoviral vector expressing firefly luciferase
(s)AML	(Sekundäre) Akute Myeloische Leukämie
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1
Ara-C	Cytosin-Arabinosid
ASCT	Autologous stem cell transplantation
ASXL1	Additional sex combs like 1
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 antagonist killer
Bax	BCL2 Associated X protein
Bcl	B-cell lymphoma
BFU-E	Erythroid Burst Forming Unit
BH	Bcl-2 homology
(t)Bid	(Truncated) BH3 interacting-domain death agonist
BIT	Bovine serum albumin, insulin, and transferrin
BMMNC	bone marrow mononuclear cells
BSA	Bovine serum albumine
CAM	Cell-cell adhesion molecules
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin-dependent kinase
CFU-GEMM	Colony Forming Unit – Granulocytes, Erythrocytes, Macrophages and Megacaryocytes
CFU-GM	Colony Forming Unit – Granulocytes and Macrophages
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid (chemische Formel)
c-Myc	Member of the immediate-early gene family
del5q	Deletion des langen (=q-)Arms von Chromosom 5
DISC	Death inducing signaling complex
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DRaf1	DsRNA-activated factor
EDTA	Ethyldiamintetraazetat
EL08.1D2	Embryonic liver derived (cell line)
ESA	Erythropoiesis stimulating agents
ETV6	ETS (=E26 transformation specific) translocational variant 6
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated-death-domain
Fas	Fs7 associated cell surface antigen
Fc	Fragment crystallizable
FCS	Fetal calw serum
FDA	Food and Drug Administration (USA)
FDCP	Factor-Dependent Continuous cell lines (Paterson Laboratories)
FG	Functional grade

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Flt3	Fms-like tyrosine kinase 3
g	Gramm
G-/GM-CSF	Granulocyte (macrophage) – colony stimulating factor
h	Stunden
(d)H ₂ O	(Destilliertes) Wasser (chemische Formel)
Hb	Hämoglobin
Hik	Histidine kinase
Hrk	Activator of apoptosis harakiri
HLA	Human leukocyte antigen
HMA	Hypomethylierende Agenzien
HSC	Hematopoetic stem cell
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
ICD	Immunogenic cell death
IL	Interleukin
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
INT/interm.	Intermediate
IPSS(-R)	(Revised) International prognostic scoring system
IST	Immunosuppressive therapy
LDCD	Lysosome-dependent cell death
LDL	Low density lipoprotein
MACS	Magnetic cell separation
Mad	Mitotic arrest deficient
Max	Myc-associated factor X
Mcl	Myeloid cell leukemia
MDS	Myelodysplastische Syndrome
ml	Milliliter
(m/n)M	(Milli/Nano)Molar
MPT	Mitochondrial permeability transition
n	Probenanzahl
NaN ₃	Natrumazid
NET	Neutrophil extracellular traps
ng	Nanogramm
(N-)SCLC	(Non) Small cell lung cancer
(T)p53	Tumor protein 53
PBS	Phosphate buffered saline
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PNH	Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
RAEB	Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss
RBC	Red blood cell
RCD	Regulated cell death
Rcf=g	Relative Centrifugal Force, g = 9,81m/s ²
RCMD	Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien
RIC	Reduced intensity conditioning
RGD	Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode (Arginin, Glycin, Asparaginsäure)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SCF	Stem cell factor
SCID	Severe combined immunodeficiency
TET2	Tet Methylcytosine Dioxygenase 2

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TNF	Tumor necrosis factor
TPO	Thrombopoetin
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
USA	United States of America
WHO	World Health Organisation
WPSS(-R)	(Redefined) WHO adapted Prognostic Scoring System
xL	Extra-large (Bcl-xL)
xS	Extra-small (Bcl-xS)
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Die Myelodysplastischen Syndrome

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Die Myelodysplastischen Syndrome (MDS) gehören zu den häufigsten malignen Erkrankungen des Knochenmarks des älteren Menschen (Ma *et al.* 2007). Die Inzidenz beträgt fünf Fälle pro 100.000 Einwohner und steigt in der Gruppe der 70-Jährigen auf 20-50 Fälle/100.000 an. Es handelt sich um eine klonale Erkrankung der hämatopoetischen Stammzelle und ist morphologisch durch uni- oder multilineare Dysplasie des Knochenmarks gekennzeichnet (Walter *et al.* 2012, Pang *et al.* 2013).

Eine der grundlegenden Erkenntnisse der MDS-Forschung nach der Jahrtausendwende ist, dass das MDS eine eigene Erkrankungsentität und nicht nur eine Vorstufe der AML darstellt (Albitar *et al.* 2002).

MDS kann analog verschiedener Klassifikationen und Risikostratifizierungsmodelle eingeteilt werden. Zu diesen zählen die WHO-Klassifikation (Vardiman 2010), der IPSS (*International Prognostic Scoring System*, inzwischen in Form des r-IPSS aktualisiert) und der (r)-WPSS (*redefined WHO Prognostic Scoring System*) (Malcovati *et al.* 2011, Greenberg *et al.* 2012).

Erkenntnisse der zytogenetischen Diagnostik gehen bereits in die aktuellen Einteilungsmodelle ein, während molekulargenetische Marker noch nicht in die Standardeinteilungen einbezogen sind. Ziel sollte sein, neben der rein deskriptiven Beschreibung prognostischer Marker (u.a. Blastenzahl und Transfusionspflichtigkeit), auch weitere Variablen zu definieren, um eine möglichst zielgerichtete Therapie anbieten zu können.

Die Gesamtüberlebensrate über alle Risikogruppen liegt bei zwei bis drei Jahren (Gattermann *et al.* 2013). Je nach Risikoprofil des Patienten, eingeteilt nach r-IPSS liegt das Überleben jedoch im Mittel bei 8,8 Jahren in der Gruppe der Patienten mit sehr niedrigem Risikoprofil, bei 5,3 Jahren in der Niedrigrisiko-Gruppe, bei drei Jahren in der Gruppe der Patienten mit intermediärem Risikoprofil, bei 1,6 Jahren in der Hochrisiko-Gruppe und bei 0,8 Jahren in der Gruppe mit sehr hohem Risikoprofil (Greenberg *et al.* 2012).

1.1.2 Deregulierte Apoptose in Abhängigkeit der verschiedenen Risikogruppen

Die für die Apoptose verantwortlichen Mitglieder der Bcl-2-Protein-Familie sind im MDS in unterschiedlichen Risikogruppen in entgegengesetzter Weise vermehrt bzw. vermindert exprimiert (Raza and Galili 2012).

Das Niedrigrisiko-MDS ist durch eine erhöhte Apoptoserate gekennzeichnet. Der Anteil pro-apoptotischer Proteine ist im Vergleich zu anti-apoptotischen Vertretern erhöht (Bogdanović *et al.* 1997, Parker *et al.* 1998).

Dagegen sind die anti-apoptotischen Vertreter der Bcl-2-Protein-Familie in den höheren Risikogruppen vermehrt exprimiert, sowohl im Vergleich zu gesundem Knochenmark, als auch zu niedrigeren Risikogruppen (Parker *et al.* 2000). Dies führt zu deutlich verminderten Apoptoseraten bzw. zur Apoptoseresistenz (Parker *et al.* 1998).

Die Überexpression von Bcl-2-Proteinen und ein vermindertes Verhältnis pro- zu antiapoptotischen Vertretern (Bcl-xS/Bcl-xL) sind mit einer schlechteren Prognose für den Patienten verbunden. Dies zeigt sich durch ein verkürztes Gesamt-Überleben und eine kürzere Zeit bis zur leukämischen Transformation (Boudard *et al.* 2002).

1 Einleitung

1.1.3 Klinik

Klinisch sind die Myelodysplastischen Syndrome durch Anämie, Thrombopenie und/oder Leukopenie und die damit verbundenen Syndrome Leistungsabfall, Blutungs- und Infektionsneigung gekennzeichnet (Neukirchen *et al.* 2015, Gangat *et al.* 2016).

Prognostisch entscheidend ist vor allem der Übergang in eine sekundäre akute myeloische Leukämie (sAML), die bei 20 bis 30% der MDS-Patienten auftritt (Greenberg, Cox, LeBeau, *et al.* 1997).

1.1.4 Therapie

Die Therapie des MDS ist stark von der vorliegenden Risikogruppe abhängig und umfasst neben supportiven Maßnahmen v.a. auch hypomethylierende Substanzen wie 5-Azacitidine und die allogene Stammzelltransplantation. Diese ist die einzige kurative Therapieoption (Tefferi and Vardiman 2013).

Das Alter selbst ist nicht alleiniges Entscheidungskriterium für die Wahl der Therapie. Auch der Allgemeinzustand des Patienten und dessen Therapiewunsch (Wetzko and Platzbecker 2014) spielen vor allem bei Patienten der Hochrisiko-Gruppe eine Rolle. Dies führt auch dazu, dass jüngere Patienten mit niedrigerer Risikogruppe, aber mit Hinweisen für eine schlechte Prognose für eine allogene Stammzelltransplantation in Frage kommen (Gelsi-Boyer *et al.* 2012).

Des Weiteren haben sich die Möglichkeiten der medikamentösen Therapie erweitert. Lenalidomid ist seit 2006 durch die FDA in den USA, seit 2013 in Europa zur Behandlung des Niedrigrisiko-MDS bei isoliertem del(5q) zugelassen (List *et al.* 2006).

Bedeutend war überdies die Zulassung von Azacitidin (USA 2004, Europa 2008). Es hat sich vor allem als Therapiealternative bei Hochrisiko-MDS-Patienten oder im Rezidivfall herausgestellt (Fenaux *et al.* 2009, Bogenberger *et al.* 2014).

1.1.4.1 Therapie des Niedrigrisiko-MDS

Die Therapie des Niedrigrisiko-MDS erfolgt nach einem Stufenkonzept (Montalban-Bravo and Garcia-Manero 2018).

Zur Behandlung der Anämie werden Erythrozytenkonzentrate oder Hämatopoese stimulierende Wachstumsfaktoren wie Erythropoetin eingesetzt (Santini 2011). Bis jetzt konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, dass Wachstumsfaktoren das Überleben positiv beeinflussen (Montalban-Bravo and Garcia-Manero 2018). Neben der Anämie kann auch die Thrombozytopenie unter anderem mit Transfusion von Thrombozytenkonzentraten oder anabolen Steroiden behandelt werden (Kantarjian *et al.* 2010, Fenaux *et al.* 2017). Bei Siderose, meistens bedingt durch Polytransfusion, können Eisenchelatoren wie Deferasirox eingesetzt werden (Neukirchen *et al.* 2012). Eine immunmodulatorische Therapie mit Lenalidomid kann bei isoliertem del(5q) eingesetzt werden (Tang *et al.* 2017). Neuere Untersuchungen zeigen, dass Lenalidomid auch bei del(5q) negativem Befund eine Therapiealternative sein könnte (Santini *et al.* 2016).

1 Einleitung

1.1.4.2 Therapie des MDS intermediären Risikoprofils

Entscheidendes Kriterium für die Intensität der Therapie für diese Gruppe ist das Risikoprofil des Patienten. Das Vorliegen prognostisch ungünstiger Mutationen sollte zur Einleitung einer intensiveren Therapie führen.

Einige somatische Mutationen gehen allerdings aktuell noch nicht in die Risikostratifizierungssysteme ein, könnten aber einen Einfluss auf die Prognose der Patienten haben (Bejar *et al.* 2011, Chen *et al.* 2014).

Dazu zählen die Chromatin-modifizierenden Gene *EZH2* und *ASXL1*, aber auch *ETV6* und *RUNX1* (Bejar *et al.* 2011).

Es konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer leukämischen Transformation bei vorhandener *ASXL1*-Mutation höher ist, als bei *ASXL1*-Wildtypen (Chen *et al.* 2014).

Vorhandene *TET2*-Mutationen geben Hinweis über Erfolgchancen einer Therapie mit hypomethylierenden Agenzien, deren Ansprechen in den niedrigen Risikogruppen eigentlich eher mäßig ist (Bejar *et al.* 2014, Jabbour *et al.* 2015).

Bestimmte zytogenetische Veränderungen können also bei der Therapieentscheidung hin zu einer intensiveren Therapie helfen, da sie die Wahrscheinlichkeit für eine spätere Transition von niedrigerem zu höherem Risikostatus erhöhen (Greenberg, Cox, LeBeau, *et al.* 1997, Corey *et al.* 2007). Im IPSS wird darüberhinaus zwischen INT-1 und -2 differenziert.

1.1.4.3 Therapie des Hochrisiko-MDS

Die Standardtherapeutika für Patienten in der Hochrisiko-MDS-Gruppe sind die hypomethylierende Agenzien (HMA). Azacitidin konnte im Gegensatz zu Decitabine eine Verbesserung des Überlebens in randomisierten Studien zeigen (Silverman *et al.* 2002, Fenaux *et al.* 2009) und kann deshalb als Mittel der Wahl angesehen werden (Montalban-Bravo and Garcia-Manero 2018).

Es konnte gezeigt werden, dass Azacitidin gegenüber einer alleinigen Supportivtherapie, einer nicht-intensiven Chemotherapie oder auch einer intensiven Chemotherapie einen Vorteil bei medianem Überleben (24,5 statt 15 Monate), eine bessere 2-Jahres-Überlebensrate (51 statt 26%) und eine geringere Toxizität (Transfusionsbedürftigkeit, bessere periphere Blutwerte) hat (Fenaux *et al.* 2009).

Die einzige kurative Therapie des MDS ist die allogene Stammzelltransplantation (Warlick *et al.* 2009). Dazu ist ein verwandter oder auch fremder HLA-identischer Spender Voraussetzung (Chang *et al.* 2007).

Die Therapie sollte in Abhängigkeit von Komorbiditäten, Alter des Patienten und Verfügbarkeit eines geeigneten Spenders erfolgen (Greenberg *et al.* 2011). Das alleinige Alter des Patienten kann nicht mehr als entscheidendes Kriterium der Therapiewahl angesehen werden.

1.2 Apoptose

Die Apoptose stellt eine unwiederbringliche und schrittweise Zerstörung der Zelle dar (Greenberg 1998).

Apoptose wurde erstmals 1972 durch Kerr beschrieben (Kerr *et al.* 1972). Lange galt Apoptose als Synonym für den programmierten Zelltod, heute weiß man, dass es lediglich eine Form verschiedener Zelltodformen ist (Venderova and Park 2012, Galluzzi and Vitale 2018).

1 Einleitung

1.2.1 Der regulierte Zelltod

Apoptose ist eine Form des regulierten Zelltodes (Galluzzi and Vitale 2018).

Der regulierte Zelltod (RCD) hat im Vergleich zur akzidentellen Form des Zelluntergangs die Möglichkeit einer Modulation durch pharmakologische Wirkstoffe (z.B. Bcl2-Inhibitoren) oder genetisch bedingt, um Schlüsselkomponente des Zelltodmechanismus zu beeinflussen (Galluzzi *et al.* 2015, 2016).

RCD spielt eine wichtige Rolle in der Gewebeentwicklung, ermöglicht eine Kommunikation des Organismus durch während des Zelltods freigesetzte Moleküle und dient damit nicht nur der Bekämpfung potentiell gefährlicher Zellen (Krysko *et al.* 2012, West and Shadel 2017).

Neben der Apoptose zählen einige weitere Formen zum RCD, wobei diese prinzipiell einem eher apoptotischen oder eher nekrotischen Schema folgen können (Galluzzi and Vitale 2018).

Die nekrotische Morphologie steht dabei für einen Zelluntergang, der durch eine runde Zellform, die Schwellung des Zytoplasmas, die Ruptur der Plasmamembran und einen Austritt des Zellinhalts gekennzeichnet ist (Berghe *et al.* 2010).

Die apoptotische Morphologie dagegen ist durch die Kondensation des Chromatins (gen. *nuclear* pyknosis), Fragmentierung des Zellkerns (gen. *karyorhexis*) sowie eine anschließende Bildung von einer Membran umgebenen Körpern charakterisiert. Diese enthalten den zersetzten Zellkern sowie intakte Zellorganellen (Galluzzi *et al.* 2007).

Die verschiedenen Formen des regulierten Zelltodes sind in Abb. 1 dargestellt.

1 Einleitung

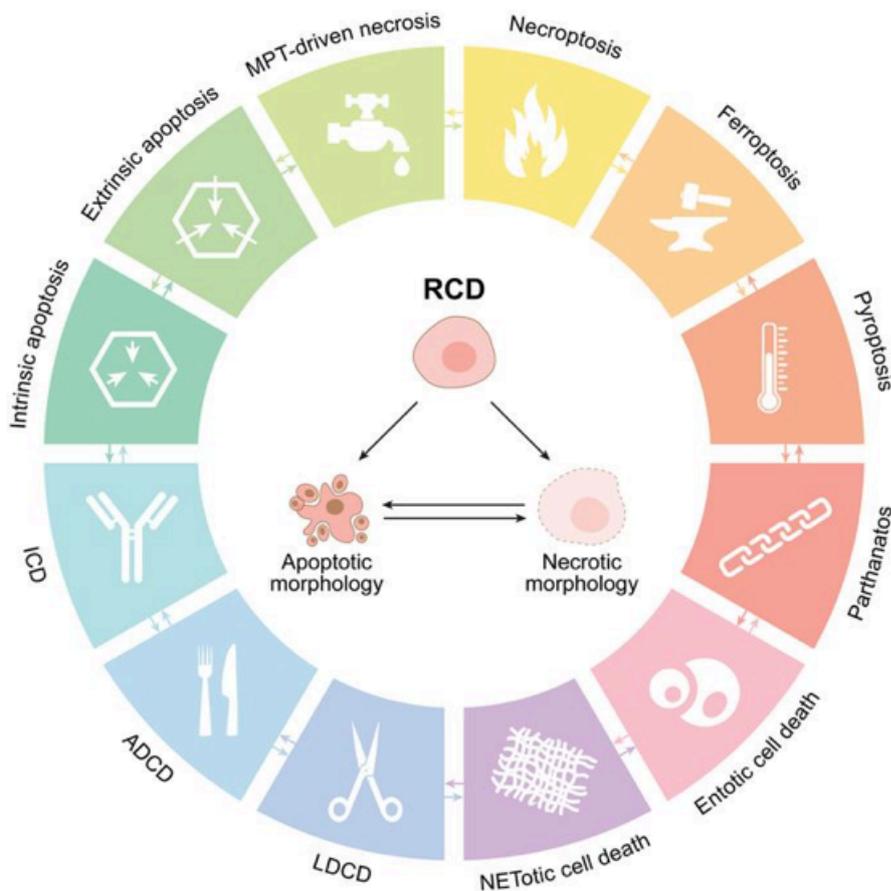


Abbildung 1: Formen des regulierten Zelltods

Durch gefährdende Einflüsse auf das extra- oder intrazelluläre Mikroumfeld kann es zur Auslösung von Signalkaskaden kommen, die zum regulierten Zelltod führen. Die Art des Zelltods variiert zwischen einer apoptotischen und nekrotischen Form, wobei der Großteil nicht eindeutig einer bestimmten Morphologie zuzuordnen ist, modifiziert nach Galluzzi *et al.* 2018 (RCD=regulated cell death, MPT=mitochondrial permeability transition, NET=neutrophil extracellular traps, LDCD=lysosome-dependent cell death, ADCD=autophagy-dependent cell death, ICD=immunogenic cell death).

1.2.2 Apoptoseresistenz als Malignitätskriterium

Die Apoptoseresistenz gehört zu den zentralen Kennzeichen der malignen Zelle. Die Erforschung der zugrundeliegenden Veränderungen in einer maligne entarteten Zelle ist nicht nur für das Verständnis der Krankheitsentstehung, sondern auch für die Therapieentwicklung entscheidend (Adams and Cory 2007). Der Fokus der Malignitätsentstehung liegt dabei in Fehlfunktionen der Regulation normaler Zellproliferation und Homöostase. Neben der Apoptoseresistenz wurden ursprünglich fünf, inzwischen sieben weitere essentielle Veränderungen als Grundlage für die meisten vieler Krebsarten und damit als Bestandteil der Definition von Malignität herangezogen (Abb.2). Genomische Instabilität und die Entzündungsreaktion werden als diesen sieben Merkmalen zugrundeliegende Mechanismen definiert (Hanahan and Weinberg 2011).

1 Einleitung

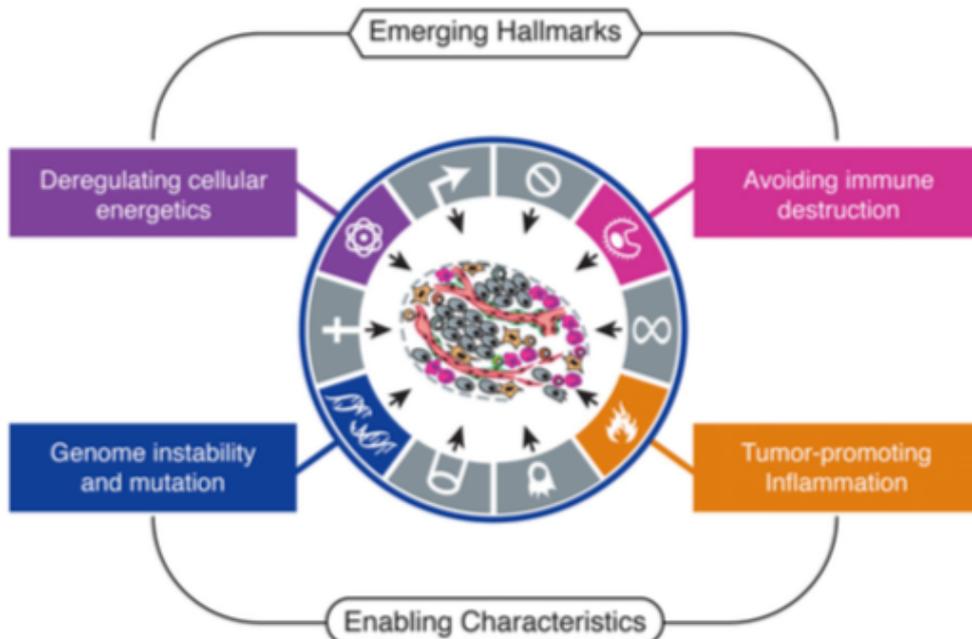


Abbildung 2: Hallmarks of Cancer – the next Generation

Definierende Fähigkeiten von Krebszellen – durch die Aktualisierung sind neben den bereits im Jahr 2000 definierten sechs „Hallmarks“ mit der Veränderung des Zellmetabolismus und der Möglichkeit des Vermeidens einer immunologischen Reaktion gegen die maligne Zelle zwei weitere Merkmale hinzugekommen. Darüberhinaus wurde festgehalten, dass die genomische Instabilität und die Entzündungsreaktion grundlegende Voraussetzungen für eine Malignitätsentwicklung sind, modifiziert nach Hanahan *et al.* 2011.

Die Apoptoseresistenz wurde unter anderem grundlegend als Malignitätskriterium erkannt, da Untersuchungen an Zellen des Follikulären Lymphoms zeigten, dass eine Hochregulation des anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2 über eine Chromosomen-Translokation das Überleben der Lymphozyten verbesserte (Tsujiimoto *et al.* 1984).

1.2.3 Pathomechanismen des MDS

1.2.3.1 Deregulierte Apoptose

Veränderungen der Apoptoseregulation sind für viele maligne, aber auch autoimmune und degenerative Prozesse maßgeblich verantwortlich (Cory and Adams 2002). Apoptose hat nicht nur einen Anteil an der Karzinogenese, sondern spielt auch eine Rolle beim Absterben dopaminerger Neurone im Rahmen der Parkinson-Erkrankung (Venderova and Park 2012) oder im Pathomechanismus der Rheumatoiden Arthritis (Sandigursky *et al.* 2017).

Deregulierte Apoptose spielt eine zentrale Rolle im MDS (Parker *et al.* 2000). Während in frühen Stadien vermehrte Apoptoseraten gefunden werden, entwickelt sich mit fortschreitendem Erkrankungsstadium eine Apoptoseresistenz. Verschiedene Risikogruppen des MDS gehen mit unterschiedlichen Apoptoseraten einher (Parker *et al.* 1998, Albitar *et al.* 2002, Adams and Cory 2007).

Die Apoptoseresistenz kann durch ein verändertes Zusammenspiel der pro- und anti-apoptotischen Signale in der Zelle erklärt werden (Kerbauy and Deeg 2007). Dabei ist das Bax/Bad – Bcl-2/Bcl-xL-Verhältnis im Niedrigrisiko-MDS im Vergleich zu gesundem Knochenmark erhöht und sinkt mit zunehmendem Erkrankungsstadium, wobei die Bcl-2-Expression ansteigt (Parker *et al.* 2000).

1 Einleitung

1.2.3.2 Pathologische Stammzell-Stroma-Interaktion und Mutator-stem-cell-Theorie

Die Deregulation der Apoptose steht im Zentrum unserer Untersuchungen. Daneben existiert die Theorie, dass toxische Einflüsse hämatopoetische Stammzellen und Stromazellen schädigen und dadurch die Interaktion zwischen diesen beiden Zelltypen so verändert wird, dass es zur Krankheitsentstehung kommt (Rosenfeld and List 2000). Des Weiteren könnten Mutationen der mitochondrialen DNA zur Entstehung des MDS-Klons und auch zu chromosomalen Veränderungen führen, die die Entwicklung der Erkrankung fördern (Greenberg *et al.* 2002).

1.2.4 Apoptose-Signalwege

Grundsätzlich kann zwischen dem intrinsischen und extrinsischen Signalweg unterschieden werden. Beide Wege führen zur Aktivierung der Caspasen 3, 6 und 7, die als gemeinsame Endstrecke gelten und Proteasen sind (Abb.3) (Thornberry and Lazebnik 1998, Adams and Cory 2007).

1.2.4.1 Der extrinsische Apoptose-Signalweg

Der extrinsische Apoptose-Signalweg, auch Death-Receptor-Pathway genannt, wird über die Bindung von Liganden aus der TNF-Protein-Familie aktiviert (Elmore 2007). Die dazugehörigen Rezeptoren auf der Zelloberfläche sind Teil der TNF-Rezeptor-Superfamilie, darunter auch Fas (Aggarwal *et al.* 2012).

Die Bindung des Liganden löst die Bildung eines sogenannten „death inducing signaling complex“, kurz DISC, aus (Dickens *et al.* 2012). Dieser Proteinkomplex am intrazellulären Teil des Rezeptors bindet über Adaptermoleküle (wie FADD) Procaspase-8. Durch deren proteolytische Aktivität wird Caspase-8 aktiviert (Muzio *et al.* 1996), welche wiederum die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 aktivieren kann.

Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass der Death-Receptor-Pathway nicht hauptverantwortlich für die teilweise pathologisch erhöhte Apoptoserate ist (Slape *et al.* 2012).

In dieser Arbeit wird primär die Beeinflussbarkeit des mitochondrialen, Bcl-2-vermittelten Apoptose-Signalweges untersucht.

1 Einleitung

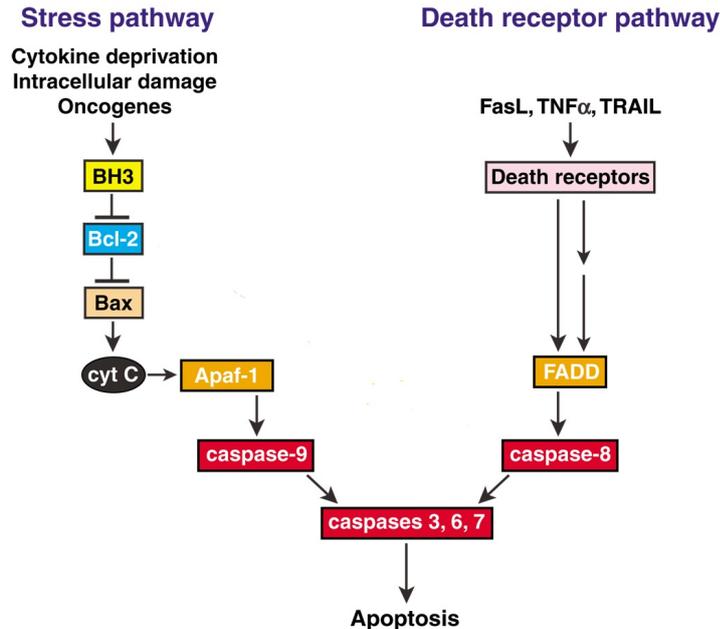


Abbildung 3: Apoptose-Signalwege

Der intrinsische Apoptose-Signalweg wird von den BH3-only Proteinen eingeleitet, welche die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine inaktivieren und damit die Hemmung von Bax und Bak verhindern. Bax oder Bak können die äußere Mitochondrienmembran durchlässig machen, wodurch unter anderem Cytochrom C freigesetzt wird, welches Apaf-1 veranlasst, Caspase-9 zu aktivieren. Der extrinsische Apoptose-Signalweg wird durch die Bindung bestimmter Liganden aus der TNF-Protein-Familie aktiviert. Dadurch wird die Bildung eines intrazellulären Proteinkomplexes forciert, der über zwischengeschaltete Proteine (unter anderem FADD) Caspase-8 aktiviert. Beide Wege sind größtenteils voneinander unabhängig. In bestimmten Zellen kann allerdings der extrinsische den intrinsischen Signalweg (über tBid) aktivieren, modifiziert nach Adams and Cory 2007.

1.2.4.2 Der intrinsische Apoptose-Signalweg

Der intrinsische Apoptose-Signalweg, auch als Stress-Pathway oder mitochondrialer Signalweg bezeichnet, gilt als der evolutionär begründete und ältere der beiden Signalwege. Entscheidend für diesen sind die Mitglieder der Bcl-2-Protein-Familie (Adams and Cory 2007). Sie besteht aus pro- und anti-apoptotisch wirkenden Vertretern, wobei sie in drei Gruppen eingeteilt werden (Youle and Strasser 2008).

Eine Gruppe wird von den anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w sowie Mcl-1, A1 und Bcl-B gebildet, welche sich in vier α -helikalen Protein-Sequenz-Motiven gleichen (Chipuk *et al.* 2010, Strasser *et al.* 2011). Diese Sequenz-Motive werden BH (=Bcl-2 homology)-Domänen genannt (Cory *et al.* 2003, Letai 2005).

Die pro-apoptotischen Vertreter Bax, Bak und Bok gleichen sich ebenfalls in diesen vier Domänen (Kvansakul *et al.* 2008, Ke *et al.* 2015).

Die Gruppe der BH3-only Proteine kennzeichnet sich durch die Übereinstimmung in nur einer, der BH3-Domäne (Strasser *et al.* 2011).

Diese Domäne ermöglicht den dieser Gruppe zugehörigen Proteinen Bad, Hik, Hrk, Bid, Bim, Bmf, Noxa und Puma die Apoptoseinduktion, am ehesten durch Hemmung der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine (Chen *et al.* 2005).

Bei intrazellulärem Stress bindet eines der aktivierten BH3-only Proteine über die α -helikale, amphipathische Domäne in einer hydrophoben Tasche des antiapoptotischen Proteins und induziert dadurch schlussendlich Apoptose (van Delft *et al.* 2006). Allerdings sind nur Bim, Puma und tBid in der Lage, alle Bcl-2-Proteine zu hemmen (Abb. 4) (Chen *et al.* 2005). In der gesunden Zelle hemmen die anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Protein-Familie die Wirkung nachgeschalteter Proteine und damit die Apoptose (Adams and Cory 1998). Überwiegt allerdings die

1 Einleitung

Hemmung der anti-apoptotischen Proteine durch z.B. Bim oder Bad, werden Bax und Bak nicht gehemmt, bilden Poren in der äußeren Mitochondrienmembran und schädigen das Endoplasmatische Retikulum und den Zellkern (Adams and Cory 2007).

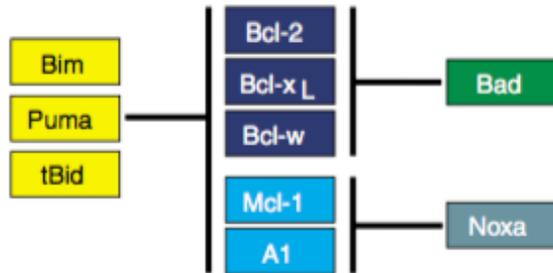


Abbildung 4: Bindungsprofile der BH3-only Proteine

Modifiziert nach Adams and Cory 2007

Der konsekutive Austritt von Cytochrom C aus den Mitochondrien begünstigt die Bildung von Apaf-1 (Zou *et al.* 1997). Dieses bildet für Cytochrom C das Gerüst für die Aktivierung der Caspase-9 (Pop *et al.* 2006).

Am Ende beider Wege steht die Aktivierung der Effektor-Caspasen (3, 6 und 7), die die Spaltung der zellulären Bestandteile initiieren (Adams and Cory 2007). In 30 bis 120 Minuten werden die Zellmembranen, das Zytoplasma- und Kernskelett zersetzt, das Zytosol ausgestoßen und die Chromosomen und der Kern zerkleinert. Das Übrige wird von umgebenden Zellen innerhalb von 24 Stunden abgebaut (Wyllie *et al.* 1980).

1.3 Das BH3-Mimetikum ABT-737 und der selektive Bcl-2-Inhibitor ABT-199 als potente Modifikatoren des intrinsischen Apoptose-Signalwegs

ABT-737 ist ein von der Firma Abbott Laboratories entwickeltes, kleines organisches Molekül mit hoher Affinität zur BH3-Domäne von Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w, aber nicht zu Mcl-1, Bcl-B und A1 (Oltersdorf *et al.* 2005). Damit wirkt es wie das BH3-only Protein Bad (Abb. 4), stört die Interaktion zwischen anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen und Bax und fördert, Bak-vermittelt, den intrinsischen Apoptose-Signalweg (Cragg *et al.* 2009). ABT-737 induziert in Anwesenheit von Bax und Bak Apoptose (Letai 2005). Gezeigt wurde dies bereits in Primärproben des Follikulären Lymphoms sowie in CLL- und SCLC-Zelllinien (Oltersdorf *et al.* 2005). Des Weiteren konnte ABT-737 Apoptose in AML-Zellen *in vitro* induzieren ohne gesunde hämatopoetische Vorläuferzellen zu schädigen (Konopleva *et al.* 2006). Im Leukämie-Mausmodell (SCID-Mäuse, FDCP-DRaf1-Zellen mit AdLux-F/RGD-Vektor infiziert) konnte die Leukämie-Last um die Hälfte gesenkt und das mediane Überleben durch Einsatz von ABT-737 gesteigert werden (Konopleva *et al.* 2006). In einem weiteren Xenograft-Modell wurde dies bestätigt und lediglich eine erniedrigte Thrombozytenzahl bei sonst unauffälligem Blutbild und ohne weitere auffällige Laborwerte in den ABT-737 behandelten Mäusen festgestellt (Konopleva *et al.* 2006). Auch das oral verfügbare Pendant zu ABT-737, ABT-263 (auch Navitoclax) löste in präklinischen Studien unerwünschte Thrombozytopenien aus (Rudin *et al.* 2012, Kaefer *et al.* 2014). Im Vergleich zu sechs weiteren mutmaßlichen BH3-Mimetika stellte ABT-737 den einzigen echten Wirkstoff dar (van Delft *et al.* 2006, Zhai *et al.* 2006). Hohe Mcl-1-Spiegel verhindern die Wirkung von ABT-737. Im Umkehrschluss sind niedrige Mcl-1-Spiegel, auch künstlich induziert, positiv hinsichtlich der Wirkungseffektivität (van Delft *et al.* 2006). In der Langzeitkultur von AML-Zellen aus Knochenmarksaspiraten

1 Einleitung

von Patienten mit therapierefraktärer oder wiederaufgetretener AML konnte ABT-737 die Koloniebildung deutlich reduzieren, was bei gesunden Kontrollen nicht beobachtet wurde (Konopleva *et al.* 2006, van Delft *et al.* 2006). In Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika wie Ara-C (in AML-Zelllinien) oder Paclitaxel (bei NSCLC) zeigte ABT-737 mit einer IC50 (mittlere inhibitorische Konzentration) von 35 ± 1 nM und 103 ± 2 nM hinsichtlich Bcl-2 und Bcl-xL eine sensitivierende und synergistische Wirkung und ermöglichte teilweise Dosisreduktionen (Oltersdorf *et al.* 2005, Konopleva *et al.* 2006).

Im Vergleich zu ABT-737 löst ABT-199, ein selektiver Bcl-2-Inhibitor, keine Thrombozytopenie aus (Konopleva *et al.* 2006, van Delft *et al.* 2006, Souers *et al.* 2013). ABT-199 ist bei der CLL im Rezidivfall bereits zugelassen (Stilgenbauer *et al.* 2016, Wierda *et al.* 2017) und wird bei Patienten mit AML- und MDS-Rezidiv im Rahmen von Studien untersucht (DiNardo *et al.* 2018). Es verspricht durch im Mausmodell gezeigter selektiver Bcl-2-Inhibition eine effektive Apoptoseinduktion in Bcl-2-abhängigen Tumorarten wie der ALL, dem B-Zell-Lymphom oder auch im Non-Hodgkin-Lymphom (Souers *et al.* 2013).

1.4 Bedeutung der hämatopoetischen Nische im MDS

Die Hämatopoetische Nische stellt das regulierende Mikroumfeld der hämatopoetischen Stammzelle (HSC) im Knochenmark dar (Scadden 2006, Wilson and Trumpp 2006). Durch die Kommunikation der Nischenzellen mit der HSC wird deren weitere Entwicklung bestimmt – Aufrechterhaltung des Status quo, Teilung oder weitere Differenzierung (Wilson & Trumpp 2006). Die Versorgung der Zelle und Regulation der zukünftigen Ausrichtung wird dem spezifischen Mikroumfeld, der sogenannten Hämatopoetischen oder Stamm-Zell-Nische zugeschrieben (Calvi *et al.* 2003). Dabei beteiligte Zellen sind unter anderem Osteoblasten, Osteoklasten, Endothelzellen, Adipozyten und perivaskuläre Retikularzellen (Calvi *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2003, Sugiyama *et al.* 2006, Isern and Mendez-Ferrer 2011).

Ebenso Teil der hämatopoetischen Nische sind die mesenchymalen Stamm- und Stromazellen, die eine bedeutende Rolle bei der Steuerung der Entwicklung der HSC einnehmen und selbst zu Adipozyten, Chondro- oder Osteoblasten differenzieren können (Heino and Hentunen 2008, Uccelli *et al.* 2008).

Die Kommunikation zwischen HSC und mesenchymalen Stromazellen findet sowohl durch Zell-Zell-Interaktionen, als auch durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren statt (Varnum-Finney *et al.* 2003, Tamplin *et al.* 2015).

Bereits vor einigen Jahrzehnten ist dem Mikroumfeld im Knochenmark eine Funktion in der Pathophysiologie von Erkrankungen zugesprochen worden, auch im Rahmen der Entstehung und Aufrechterhaltung des MDS (Ershler *et al.* 1980, Matzner and Polliack 1981, Ghobrial *et al.* 2018). Mausexperimente konnten zeigen, dass MDS-Zellen *in vivo* von der Anwesenheit von Stromazellen abhängig sind (Kerbaui *et al.* 2004). Der hämatopoetischen Nische wird zum Teil eine ursächliche, zum Teil zumindest eine aufrechterhaltende Bedeutung in der MDS-Pathogenese zugeschrieben (Raaijmakers *et al.* 2010, Li and Calvi 2017).

Erkenntnisse über die epigenetische Signatur mesenchymaler Stromazellen in MDS- und AML-Patienten könnten darüberhinaus den Einsatz des hypomethylierenden Agens Azacitidin, welches unter anderem bei Hochrisiko-MDS-Patienten und im Rezidivfall angewendet wird, bestärken bzw. dadurch einen Teil der Wirkung erklären (Geyh *et al.* 2013, Schroeder *et al.* 2016).

1 Einleitung

1.5 Problemstellung

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind klonale Knochenmarkserkrankungen (Walter *et al.* 2012) des älteren Menschen (Ma *et al.* 2007), die durch Dysplasien und deregulierte Apoptose gekennzeichnet sind (Pang *et al.* 2013).

Die Inzidenz des Myelodysplastischen Syndroms wird wegen der zunehmenden Lebenserwartung in Zukunft weiter steigen (Gattermann *et al.* 2008).

Eine kurative Therapie mittels allogener Stammzelltransplantation ist auf Grund des hohen Durchschnittsalters und den zu erwartenden Komplikationen bei reduziertem Allgemeinzustand der Patienten oft nicht möglich. Neben HMA sind die Therapiealternativen für den älteren Patienten des Hochrisiko-MDS beschränkt (Fenaux *et al.* 2009).

Bereits beschrieben wurden unterschiedliche Apoptoseeigenschaften in den verschiedenen Risikogruppen des MDS (Parker *et al.* 1998; Boudard *et al.* 2002).

Das BH3-Mimetikum ABT-737 gilt als potenter Apoptoseinduktor und wurde in Primärproben des Follikulären Lymphoms, in CLL- und SCLC-Zelllinien sowie einem AML-Mausmodell getestet (Oltersdorf *et al.* 2005, Konopleva *et al.* 2006, van Delft *et al.* 2006).

Aus den bisherigen Erkenntnissen und der mutmaßlichen zukünftigen Bevölkerungsentwicklung ergibt sich die Notwendigkeit der Entwicklung einer neuen Therapiealternative für Patienten des Hochrisiko-MDS und damit auch der Untersuchung und genaueren Charakterisierung der verschiedenen Risikogruppen.

Wir haben deshalb die Apoptoseinduktion durch ABT-737 an MDS-Knochenmarkszellen *in vitro* untersucht. Als gesunde alterskorrelierte Kontrollen wurden Knochenmarkszellen aus Hüftköpfen verwendet. Des Weiteren wurden die Auswirkung von ABT-737 auf die Koloniebildungsfähigkeit der MDS-Vorläuferzellen und der Einfluss der Stromaprotektion auf die Wirkung von ABT-737 untersucht.

Diese Arbeiten dienen als Grundlage für weiterführende Forschung mit dem Bcl-2-selektiven Inhibitor ABT-199.

2 Material und Methoden

2.1 Verarbeitung humaner Proben

Um Knochenmarkzellen auf ihr Apoptoseverhalten untersuchen zu können, wird humanes Material aufbereitet. Dabei ist zu unterscheiden, ob eine Probe der Kontrollgruppe, also hämatologisch gesunder alterskorrelierter Patienten, oder eine MDS-Probe vorliegt.

Die Verwendung des humanen Materials im Rahmen des Projekts wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät des Klinikums rechts der Isar am 30.04.2010 genehmigt (Projekt-Nummer 2790/10).

2.1.1 Alterskorrelierte gesunde Kontrolle aus Hüftköpfen

Grundlage zur Beurteilung der Reaktion pathologischer Knochenmarkzellen auf den verwendeten Apoptoseinduktor ist eine alterskorrelierte gesunde Kontrollgruppe als Vergleich. Dazu wurden Hüftköpfe von Patienten nach Totalendoprothese verwendet.

Nach anamnestischem und laborchemischem Ausschluss einer malignen Grunderkrankung wurde nach Rücksprache mit der orthopädischen Abteilung eine Probe zur Aufbereitung verwendet. Der Patient willigte dafür nach Information über das Projekt und Unterschrift der Einverständniserklärung im Rahmen des stationären Aufenthalts ein.

2.1.1.1 Aufbereitung

Möglichst rasch nach Explantation des Hüftkopfs wird mit der Weiterverarbeitung begonnen, um möglichst viel vitales Gewebe gewinnen zu können.

Der erste Arbeitsschritt wird in einer *sterilen Werkbank (Herasafe KS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)* durchgeführt. Die Arbeitsfläche wird desinfiziert und ein steriles Tuch ausgelegt. Anschließend werden aus der vorhandenen Probe mittels Knochenzange und anatomischer Pinzette Knochenmarkchips herauspräpariert und diese in eine Petrischale gegeben. Das gewonnene Material wird in ein mit 20ml *Phosphate buffered Saline (PBS; Thermo Fisher Scientific)* befülltes *50ml-Falcon-Röhrchen (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA)* gegeben. Der Inhalt wird gut geschüttelt, um die Zellen aus dem Markgewebe zu lösen. Im nächsten Schritt wird die Zelllösung mittels auf dem *Accu Jet Pro (Brand, Wertheim)* aufgesteckter serologischer Pipette (*10ml; Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich*) in ein neues *50ml-Falcon-Röhrchen* überführt. Dieses ist mit einem *Falcon Zellsieb (100µm; Becton-Dickinson)* bedeckt, um in der Lösung verbliebene Gewebebestandteile abzufiltrieren. Die weiteren Verarbeitungsschritte unterscheiden sich nicht zu denen der MDS-Proben (siehe 2.1.2).

2.1.2 MDS-Zellen aus Knochenmarkspunktionsmaterial

Um das Ansprechen der MDS-Knochenmarkzellen auf das BH3-Mimetikum einschätzen zu können, wurde humanes Material verwendet, das im Rahmen von diagnostischen oder den Therapieverlauf überprüfenden Punktionen gewonnen wurde.

2 Material und Methoden

2.1.2.1 Aufbereitung

Das Material Knochenmark-punktierter Patienten wird in der *sterilen Werkbank* in ein *15ml-Falcon-Röhrchen* überführt und mit *Phosphate buffered Saline* auf 10ml aufgefüllt. Dieses Volumen wird in ein *50ml-Falcon-Röhrchen* gefüllt. Das weitere Vorgehen ist für beide Arten von Proben vorerst identisch.

2.1.3 Probenart-unabhängige Weiterverarbeitung

Die nun im *50ml-Falcon-Röhrchen* befindliche Zelllösung (MDS-Probe oder gesunde alterskorrelierte Kontrolle) wird mit Hilfe der *Biocoll-Trennlösung* (*Biochrom, Berlin*) separiert. Hierbei wird ein neues *50ml-Falcon-Röhrchen* zuerst mit der gleichen Menge der *Biocoll-Trennlösung* (je nach Ausgangsvolumen im Röhrchen circa 10 bis 20ml) befüllt und auf dieses Volumen vorsichtig die Zelllösung aufgeschichtet, optimalerweise ohne Vermischung der Lösungen. Das verschlossene *50ml-Falcon-Röhrchen* wird dann bei 800 rcf=g für 15 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremsvorgang zentrifugiert (*Zentrifuge: Heraeus Multifuge 3s, Thermo Fisher Scientific*). Die dadurch entstandene Zwischenschicht, die die für die weitere Untersuchung benötigten mononukleären Zellen des Knochenmarks enthält, wird mit einer *1ml-Pipettenspitze* (*Th. Geyer, Renningen*) aspiriert. Diese Suspension wird in ein neues *15ml-Falcon-Röhrchen* gegeben, das bei 330 rcf=g für fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert wird. Dabei entsteht ein Zellhaufen am Boden des Röhrchens. Die darüber befindliche Flüssigkeit wird abgesaugt. Ist der Zellhaufen stark rot gefärbt, enthält er viele Erythrozyten, die für die In-Kulturnahme unnötig und störend sind. Deshalb werden diese mittels *G-DEX II RBC Lysis buffer* (*HiSS, Freiburg*) lysiert. Dazu wird 1ml dieser Lösung auf das verbliebene Zellpellet gegeben und dieses vorsichtig damit resuspendiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Beendigung der Lysereaktion und zur In-Kulturnahme wird nach der Inkubationszeit *RPMI Medium 1640* (*Thermo Fisher Scientific*) mit *5-10% Fetal Calw Serum* (*FCS; Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund*) hinzugegeben, sodass genau 10ml Zellsuspension vorliegen. Dadurch lässt sich in der Folge die Zellzahl bestimmen. Zur Auszählung sind 10µl der 10ml Gesamtvolumen nötig. Dies wird in 90µl *Trypanblau* (*Thermo Fisher Scientific*) resuspendiert und dann wiederum 10µl davon mittels *Neubauer Zählkammer* zur Bestimmung der gewonnenen Zellzahl am *Mikroskop* (*Axiovert 40 C, Carl Zeiss, Feldbach, Schweiz*) verwendet.

2.1.4 Zellzahl-abhängige Versuchsgestaltung

Je nach Ergebnis der Zellzahlbestimmung kann der weitere Versuch geplant werden. Die Untersuchung der Wirkung des BH3-Mimetikums kann sowohl an nicht-vorselektionierten mononukleären Knochenmarkzellen, als auch an mononukleären CD34⁺-Vorläuferzellen erfolgen, an denen die Wirkung hinsichtlich der eigentlichen Ätiologie der Myelodysplastischen Syndrome direkter untersucht werden kann. Dazu folgt auf die beschriebenen Schritte ein Aufreinigungsprozess des Materials, der über Antikörper-gebundene Magneten eine Selektionierung der gewünschten Zellen vom übrigen Material erlaubt.

Im gesunden Knochenmark beträgt der Anteil der CD34⁺-Zellen ca. 1%. Eine Aufreinigung humaner mononukleärer Knochenmarkzellen erfolgte daher erst ab einer Gesamtzahl über 1×10^8 .

2 Material und Methoden

2.1.4.2 Aufreinigung mononukleärer Vorläuferzellen

Bei mehr als 1×10^8 Zellen ist eine Aufreinigung auf CD34⁺-Zellen sinnvoll. In der Population der CD34⁺-Zellen befindet sich die MDS-Stamm-/Progenitorzelle (Woll *et al.* 2014).

Zur Aufreinigung wird das mit 10ml gefüllte *15ml-Falcon-Röhrchen* zuerst für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 300 rcf=g zentrifugiert. Danach wird die über dem Zellpellet befindliche Flüssigkeit in der *sterilen Werkbank* abgenommen und ab jetzt mit dem *CD34 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)* zur Aufreinigung gearbeitet. Inhalt dessen ist ein Fläschchen *Blocking reagent* und ein Fläschchen *CD34 MicroBeads*. Als Puffer wird eine im Folgenden als *MACS buffer* bezeichnete Lösung verwendet. Inhalt dessen sind 500ml *PBS*, 2,5g *bovine serum albumine* (also 0,5%, *BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA*), 2ml *Ethyldiamintetraacetat* (aus 0,5M Stock, 2mM final, *EDTA, AMRESCO, Cleveland, Ohio, USA*), welches mit einem *Magnetrührer (RH basic 2, IKA, Staufen)* vermischt und daraufhin steril filtriert wird. Im Einzelversuch wird die Selektionierung exakt nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wird zuerst 300µl des *MACS buffers* auf das Zellpellet gegeben und resuspendiert. Waren deutlich mehr als 1×10^8 Zellen zur Aufreinigung vorhanden werden die Volumina der Reagenzien verdoppelt. Anschließend gibt man 100µl des *Blocking reagent* und 100µl *CD34 MicroBeads* nacheinander zur Zellsuspension. Das *Falcon-Röhrchen* wird nun zur Inkubation 30 Minuten auf Eis gestellt und alle fünf Minuten vorsichtig kurz geschüttelt. Nach dieser Zeit werden 10ml *MACS buffer* dazugegeben und die Lösung bei 4°C für zehn Minuten mit 300 rcf=g zentrifugiert (*Heraeus Megafuge 1.0R, Thermo Fisher Scientific*). Der nächste Schritt ist die *Magnetic separation*. Hierzu wird erneut der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 500µl (oder 3ml, s.u.) *MACS buffer* resuspendiert. Dann wird dieses Volumen durch die sogenannte *MACS column (Miltenyi Biotec)* gegeben, eine magnetische Säule, die auf einer magnetischen Halterung (*MACS separator, ebenfalls Miltenyi Biotec*) angebracht wird. Je nach Zellzahl wird dabei die größere oder kleinere Säule gewählt (*MS* mit 500µl, *LS* mit 3ml). Dabei werden die magnetisch gekoppelten Antikörper, die an die CD34⁺-Zellen binden, im Reservoir der Säule fixiert und alles CD34⁻ fließt hindurch und kann verworfen werden. Nachdem die Säule ausreichend mit *MACS buffer* gespült wurde (*MS*: drei mal 500µl, *LS*: drei mal 3ml), kann sie vom Gestell genommen und mit 1 bzw. 5ml kräftig mit einem dafür vorgesehenen Spritzenstempel (*Miltenyi Biotec*) durchgedrückt werden, sodass sich die anheftenden Zellen lösen. Im unter der Säule stehenden *15ml-Falcon-Röhrchen* befinden sich dann die CD34⁺-Zellen in Suspension und können mittels *Neubauer Zählkammer am Mikroskop* ausgezählt und die Suspension anschließend wieder bei 4°C und 330 rcf=g für fünf Minuten zentrifugiert werden.

2.1.5 Zellkultur

2.1.5.1 In-Kulturnahme der Zellen und Zugabe von ABT-737

Zur In-Kulturnahme wird ein serumfreies Kurzzeitmedium angesetzt, mit dem die Inkubation über 72 Stunden möglich ist. Dazu werden für 10ml des Kurzzeitmediums folgende Bestandteile benötigt: 8ml *IMDM + GlutaMAX™ (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Thermo Fisher Scientific)*, 2ml *BIT 9500 Serum Substitute (STEMCELL technologies, Vancouver, Canada)*, 7,6µl *Low Density Lipoprotein (LDL,*

2 Material und Methoden

Sigma-Aldrich), 2µl β -Mercaptoethanol (10µM, *Thermo Fisher Scientific*). Die Zusätze sind dann: 40µl *murine Stem Cell Factor* (400ng/ml, *SCF, eBioscience, San Diego, California, USA*), 10µl *Flt3-Ligand* (100ng/ml, *R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA*), 1,7µl *murine Thrombopoetin* (100ng/ml, *mTPO, R&D Systems*), 2µl *Interleukin 3* (10ng/ml, *IL3, R&D Systems*), 1µl *Interleukin 6* (5ng/ml, *IL6, R&D Systems*).

Die Zellen werden in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen pro ml Medium in eine 24-well-Platte (*Sarstedt, Nümbrecht*) ausgesät. Nicht für Zellen verwendete wells werden mit 1ml *Phosphate buffered Saline* befüllt. Pro Medium-gefülltem well wird *ABT-737* (*Active Biochem, Maplewood, New Jersey, USA*) oder als Lösungsmittelkontrolle *Dimethylsulfoxid* (*DMSO, Sigma-Aldrich*) bei einer Endkonzentration von 1µM, also hier 1µl, hinzugegeben. Die 24-well-Platte wird in einem *Inkubator* (37°C + 5% CO₂, *Revco Ultima, Thermo Fisher Scientific*) gelagert. Je nach Versuchsaufbau folgt nach 24, 48 oder 72 Stunden die Vorbereitung der Zellen zur Analyse am Durchflusszytometer.

2.1.5.2 Durchflusszytometrische Analyse

Das Durchflusszytometer, im Folgenden als *FACS* (für *fluorescence-activated cell sorting; Canto II, Becton-Dickinson*) bezeichnet, dient der Feststellung der Viabilität der Zellen. So kann die Wirkung des BH3-Mimetikums eingeschätzt werden.

Zum Zeitpunkt der In-Kulturnahme wird ein 0h-Wert gemessen.

Je nach Versuchsaufbau und verfügbarer Zellzahl wird nach 24 und 48 Stunden, mindestens aber zum Endzeitpunkt nach 72 Stunden erneut gemessen.

2.1.5.2.1 FACS-Vorbereitung

Zur Untersuchung der Zellen im *FACS* werden diese aus dem Kultur- bzw. zum 0h-Zeitpunkt aus dem Aufbewahrungsmedium extrahiert. Dazu wird entweder direkt die übrige Zellsuspension zum 0h-Zeitpunkt oder mit Kulturmedium angesetzte Zellen aus dem jeweiligen well vorsichtig ausgespült und in ein für die *FACS*-Vorbereitung spezielles Reagenzglas gefüllt. Die Suspension wird im Reagenzglas für fünf Minuten bei 330 rcf=g und 4°C zentrifugiert (*Rotina 420R; Hettich, Tuttlingen*), der Überstand abgeschüttet und 3ml *FACS-Puffer* (*PBS + 5% FCS, Thermo Fisher Scientific bzw. Capricorn Scientific*) auf das übrige Zellpellet gegeben. Beide Komponenten werden durch *Vortex Genie 2* (*Scientific Industries, New York, USA*) schonend vermischt und eine fünfminütige Zentrifugation bei 330 rcf=g und 4°C angeschlossen und anschließend der Überstand abgeschüttet. Die für die *FACS*-Analyse benötigten Antikörper werden in 10µl Suspension wie folgt vorbereitet: 2µl des *CD34-Antikörpers* (*Anti-Human CD34 eFluor® 450, eBioscience*), 0,4µl *Fc-Block* (*Anti-Mouse CD16/CD32 FG purified, eBioscience*) und 7,6µl *FACS-Puffer*. Dieses wird nach Vermengung für circa 25 Minuten bei 4°C inkubiert, um die Bindung des Antikörpers zu ermöglichen. Nach der Inkubationszeit wird 3ml *Annexin-V-binding-buffer* (=FACS-Puffer) hinzugegeben und die Suspension wiederum bei 330 rcf=g und 4°C zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstands wird 3,2µl *Annexin-V-GFP* (s.2.1.5.2.2, aufgereinigtes Protein in PBS + 10 mM NaN₃ aufgenommen, 1mg/ml, hergestellt von S. Spinner, III. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München) hinzugefügt. Das Zellpellet wird mit der Flüssigkeit durch den *Vortex* schonend vermischt und für circa zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wird für fünf Minuten bei 330 rcf=g und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Der letzte Schritt

2 Material und Methoden

vor der eigentlichen Untersuchung ist die Zugabe von 5µl 7AAD (s.2.1.5.2.2, *eBioscience*). Nach Vermengung mit dem *Vortex* folgt wieder eine fünfminütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur bevor die *FACS*-Analyse gestartet wird.

2.1.5.2.2 Auswertung

Die Auswertung der durch die *FACS*-Analyse gewonnenen Daten erfolgt mittels *Flow-Jo-Software* (*Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA*). Dadurch kann der Apoptosegrad anhand der generierten Abbildung bestimmt und somit eine Aussage über die Lebendigkeit der Zellen (+/- ABT-737) erhalten werden. Annexin-V (x-Achse der Darstellung) gilt als Marker eines frühen Stadiums der Apoptose, da es an einen auf der Membranninnenseite liegenden Membranbestandteil (membrane phospholipid phosphatidylserine) bindet, welches im Rahmen der Apoptose an die Außenseite gelangt. 7AAD (7-Aminoactinomycin D, y-Achse) dagegen bindet an DNA, was eine Zerstörung des Zellkerns voraussetzt und damit als Zeichen der späten Phase der Apoptose gewertet werden kann. Die Kombination dieser beiden Marker erlaubt eine relativ exakte Charakterisierung der Lebendigkeit der Zellen. Mit der Software erfolgt dadurch die graphische Darstellung der Lebendigkeitsraten der Proben. Somit können die verschiedenen Ansätze mit und ohne BH3-Mimetikum und im Verhältnis zum 0h-Zeitpunkt miteinander verglichen werden.

2.1.6 Stromazell-Co-Kultur

Zur exakteren Abbildung der *in vivo* Bedingungen von Knochenmarkzellen unter Einwirkung des BH3-Mimetikums wurde eine Co-Kultur mit murinen Stromazellen durchgeführt. Die Stromazellen wurden von Prof. Dr. Robert A.J. Oostendorp (III. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Zellen der Linie EL08.1D2, die aus der Mausleber im embryonalen Stadium gewonnen wurden (Oostendorp *et al.* 2002). In der Co-Kultur werden Stromazellen zusammen mit Knochenmarkzellen der Patientenproben kultiviert. Der einzige Unterschied zu den vorher beschriebenen Kulturbedingungen ist das Vorhandensein der stark am Boden des Reagenzgefäßes adhärennten Stromazellen und der vorangehenden mikroskopischen Überprüfung deren Dichte. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Bewuchs nicht zu dicht ist, da sonst keine idealen Kulturbedingungen hinsichtlich des protektiven Einflusses der Stromazellen auf die humanen Knochenmarkzellen herrschen könnten. In der weiteren Prozedur gibt es keinen Unterschied bei der In-Kulturnahme der Zellen ohne Stromazellen. Bei der Analyse der Lebendigkeit mittels *FACS* wurde zusätzlich zu den üblichen Messungen noch eine Messung einer reinen Stromazellprobe angefertigt, um die Lebendigkeit und damit Effektivität der Stromazellen selbst überprüfen zu können und die Stromazellen in der Analyse der Daten von den eigentlich zu untersuchenden Zellen abgrenzen zu können (Abb. 11C).

2.1.7 Colony formation assay

Um die Auswirkungen des BH3-Mimetikums auf die für die Erkrankung verantwortlichen hämatopoetischen Vorläuferzellen weiter untersuchen zu können, ist die Langzeitkultur in *Methylcellulose* (*MethoCult™ H4435 enriched, STEMCELL technologies*) angewandt worden.

2 Material und Methoden

2.1.7.1 Vorbereitung

Die in der *24-well-Platte* kultivierte Zellsuspension wird nach 72h in ein *15ml-Falcon-Röhrchen* überführt. Um das Kulturmedium auszuwaschen wird dreimalig 12ml *PBS* hinzugegeben, die Suspension jeweils bei 330 rcf=g bei 4°C für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand steril abgenommen und die Zellen gezählt. Pro Colony formation assay wird 2ml *Methylcellulose* verwendet, die, in einem *15ml-Falcon-Röhrchen* aliquotiert, eingefroren aufbewahrt wird. Nach dem Auftauen werden 25µl *Pen-Strep (Penicillin-Streptomycin; Thermo Fisher Scientific)* hinzugegeben. Nach Erhalt der exakten Zellzahl werden die Zellen in *IMDM + GlutaMAX™* so verdünnt, dass in 200µl ungefähr 500 Zellen enthalten sind, die dann in das mit *Methylcellulose* befüllte *15ml-Falcon-Röhrchen* gegeben werden. Diese Bestandteile werden ungefähr 30 Sekunden mit dem *Vortex* vermischt. Da sich durch den Mischvorgang in der Suspension starke Blasen bilden, muss mit der In-Kulturnahme abgewartet werden bis sich diese verflüchtigt haben. In der Zwischenzeit werden die *Zellkulturschalen (Greiner Bio-One)* vorbereitet. Hierbei werden in eine *10cm-Zellkulturschale* drei *3cm-Zellkulturschalen* nebeneinander platziert. Pro *3cm-Zellkulturschale* ist dann 1ml *Methylcellulose-Zell-Suspension* enthalten. Pro ursprünglichem well sind dann zwei Colony formation assays vorhanden. Die dritte *3cm-Zellkulturschale* wird mit 3ml *dH₂O (B. Braun, Melsungen)* befüllt, um der Vertrocknung der Langzeitkulturen im *Inkubator* vorzubeugen. Im *Inkubator* selbst ist die Kontrolle der Feuchtigkeit grundlegende Bedingung eines erfolgreichen Experiments. Dabei sollte stets eine gut mit *dH₂O* angefüllte Schale innenliegend sein. Die *Zellkulturschalen* werden bei 37°C + 5% CO₂ für insgesamt zehn bis 14 Tage bebrütet. Nach sieben Tagen wird eine erste Kontrolle durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Feuchtigkeit ausreichend ist.

2.1.7.2 Auswertung

Nach zehn bis 14 Tagen werden die *Zellkulturschalen* eines Experimentansatzes entnommen und die einzelnen gewachsenen Kolonien mit Hilfe eines *Rasters (Gridded Scoring Dish, STEMCELL technologies)* mikroskopisch (ebenfalls *Axiovert 40 C, Carl Zeiss, Feldbach, Schweiz*) ausgezählt. Dabei wird zwischen CFU-GM (Abb. 5B, für Colony Forming Unit – Granulocytes and Macrophages), CFU-GEMM (Abb. 5C, für Colony Forming Unit – Granulocytes, Erythrocytes, Macrophages and Megacaryocytes) und BFU-E (Abb. 5A, für Erythroid Burst Forming Unit) unterschieden. Diese wurden exemplarisch mit dem *Phasenkontrast-Mikroskop BZ900-E (Keyence, Osaka, Japan)* fotografiert.

2 Material und Methoden

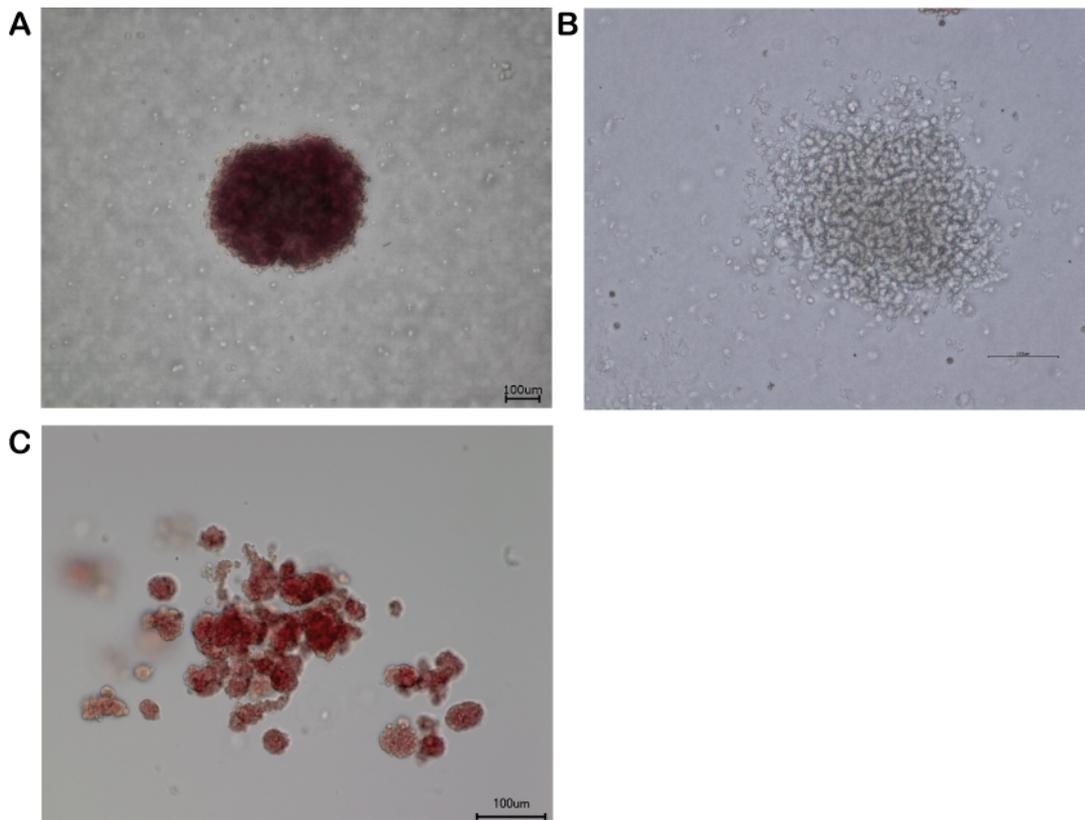


Abbildung 5: Koloniearten in der Langzeitkultur

Fotografiert mit dem Phasenkontrast-Mikroskop BZ900-E (Keyence, Osaka, Japan) (A) Erythroid Burst Forming Unit (BFU-E) (B) Colony Forming Unit – Granulocytes and Macrophages (CFU-GM) (C) Colony Forming Unit – Granulocytes, Erythrocytes, Macrophages and Megacaryocytes (CFU-GEMM)

2.2 Statistik und Darstellung

Um die Reaktion der Proben auf das BH3-Mimetikum anschaulich darstellen zu können, wird erst der Anteil lebendiger Zellen (Abb. 6A: dargestellte Plots - linker unterer Quadrant, Annexin-V negativ, 7AAD negativ) nach 72h ins Verhältnis zum Ausgangswert bei 0h gesetzt. Dadurch erhält man sowohl für den ABT-737-Ansatz, als auch für die Kontrolle einen Quotienten. Um nun unterschiedliche Proben miteinander vergleichen zu können, werden diese beiden Quotienten wiederum dividiert und man erhält das Verhältnis der Lebendigkeit der Probe mit BH3-Mimetikum zur Probe ohne dieses. Dadurch können Rückschlüsse auf die Effektivität der Apoptoseinduktion durch ABT-737 gezogen werden. Zur Berechnung der Signifikanzlevels wurde der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Alle p-Werte sind zweiseitig und mit einem Signifikanzlevel von 0,05.

2.3 Klassifikation der Risikogruppen des MDS

Die Einteilung der MDS-Patientenproben in Risikogruppen erfolgte mittels gängiger Klassifizierungssysteme und dient im klinischen Alltag der Einschätzung des Überlebens und der Wahrscheinlichkeit der Progression der Erkrankung in eine sekundäre akute myeloische Leukämie. Es wurde die WHO-Klassifikation von 2008 (Vardiman 2010), der r-WPSS (*redefined WHO adapted Prognostic Scoring System*) (Malcovati *et al.* 2011), der IPSS (*International Prognostic Scoring System*) (Greenberg, Cox, Lebeau, *et al.* 1997) und die zytogenetische Risikobewertung (im Folgenden als Cytogenetic Risk Score bezeichnet, Schanz *et al.* 2012)

2 Material und Methoden

herangezogen. Die WHO-Klassifikation von 2008 unterteilt das MDS anhand der vorhandenen Zytopenie(n) im peripheren Blut und der Veränderungen im Knochenmark selbst (Blasenanteil, Dysplasien, Vorhandensein der 5q-Deletion, mikroskopische Befunde wie Auer-Stäbchen) (Vardiman *et al.* 2009).

Der r-WPSS bezieht neben dem Stadium der WHO-Klassifikation den Karyotyp und das Transfusionsbedürfnis, orientiert am Hb, mit ein und gilt damit als stark an der Klinik orientiertes Risikoklassifizierungssystem. Im IPSS sind der Blastenanteil, die Anzahl der Zytopenien und ebenfalls der Karyotyp vereint. Der Cytogenetic Risk Score nach Schanz *et al.* definiert zytogenetische Merkmale, die die Einordnung des Patienten in eine von fünf prognostische Untergruppen erlauben.

Seit 2016 ist eine Anpassung der WHO-Klassifikation für hämatologische Neoplasien veröffentlicht. Hinsichtlich des MDS werden morphologische Veränderungen und die Zytopenien genauer definiert. Die Zytopenie wird fest in die Diagnose jedes MDS-Typs einbezogen. Die Nomenklatur umfasst nun neben der Art der Dysplasie das Vorhandensein von Ringsideroblasten, den Blastenanteil und die 5q-Deletion (Arber *et al.* 2016).

3 Ergebnisse

3. Risikogruppen-abhängige Apoptoseinduktion in Vorläuferzellen des Knochenmarks

Deregulierte Apoptose spielt eine zentrale Rolle im MDS (Parker *et al.* 2000). Während in frühen Stadien erhöhte Apoptoseraten gefunden werden, entwickelt sich im Verlauf der Erkrankung eine Apoptoseresistenz. Verschiedene Risikogruppen des MDS gehen mit unterschiedlichen Apoptoseraten einher (Adams & Cory 2007; Parker *et al.* 1998; Albitar *et al.* 2002).

Die Anwendung des BH3-Mimetikums ABT-737 soll zeigen, ob die Apoptoseresistenz der Hochrisiko-MDS-Knochenmarkzellen durchbrochen werden kann.

Dazu wurden Knochenmarkaspirate von 59 MDS-Patienten unterschiedlicher Risikogruppen und 13 Patienten mit sekundärer AML für die Versuche miteinbezogen (Tab. 1). Die Proben wurden direkt nach Gewinnung verarbeitet, um optimale Untersuchungsbedingungen zu ermöglichen und keine Zellschädigung durch Konservierungsschritte auszulösen.

3 Ergebnisse

Patient ID	Age	Gender	WHO category	Karyotype	Severe anemia	Sum of individual variables (r-WPSS)	r-WPSS category	IPSS category	Cytogenetic risk score (Schanz et al.)
1	47	male	RARS	46, XY	absent	0	very low	low risk	good
2	74	male	RCMD	46, XY	absent	1	low	low risk	good
3	72	male	RCMD	46, XY	absent	1	low	low risk	good
4	59	female	RCMD	46, XX	absent	1	low	low risk	good
5	73	male	RCMD	46, XY	absent	1	low	int.-1	good
6	83	female	RCMD	46, XX	absent	1	low	int.-1	good
7	54	male	RCMD	46, XY	absent	1	low	low risk	good
8	86	male	RCMD	46, XY, del(5)(q14q34)	absent	0	very low	low risk	good
9	52	female	RCMD	46, XX, del(5)(q14q34)	absent	0	very low	int.-1	good
10	76	male	RCMD	46, XY	absent	1	low	low risk	good
11	76	male	RCMD	46, XY	absent	1	low	low risk	good
12	77	male	RCMD	46X, -Y	absent	1	low	low risk	very good
13	74	female	RAEB-1	46, XX, del(5)(q14q34)	absent	2	intermediate	int.-1	good
14	73	female	RCMD	46, XX	present	2	intermediate	int.-1	good
15	67	female	RAEB-1	46, XX	absent	2	intermediate	int.-1	good
16	67	male	RAEB-1	46, XY	absent	2	intermediate	int.-1	good
17	74	male	RAEB-1	46, XY	absent	2	intermediate	int.-1	good
18	74	male	RAEB-1	45X, -Y	absent	2	intermediate		very good
19	58	male	RCMD	46, XY	present	2	intermediate	int.-1	good
20	71	female	RCMD	46, XX	present	2	intermediate	low risk	good
21	74	male	RCMD	46, XY del(20)(q11q13)	present	2	intermediate		good
22	54	male	RAEB-1	46, XY	absent	2	intermediate	int.-1	good
23	71	male	RCMD	46, XY del(20)(q11q13)	present	2	intermediate	int.-1	good
24	74	male	RAEB-1	46, XY	absent	2	intermediate	int.-1	good
25	86	male	RCMD	46, XY	present	2	intermediate	int.-1	good
26*	68	male	RCMD	46, XY, del(5)(q14q34)	present	1	low	low risk	good
27	70	female	RAEB-1	46, XX	absent	2	intermediate	int.-1	good
28	65	male	RAEB-1	46, XY	absent	2	intermediate	int.-1	good
29	79	male	RAEB-1	46, XY	absent	2	intermediate	int.-1	good
30	61	female	RCMD	46, XX	present	2	intermediate	int.-1	good
31	67	male	RCMD	46, XY, del(5)(q14q34)	present	1	low	low risk	good
32	53	female	RAEB-1	46, XX	absent	2	intermediate		good
33	74	male	RCMD	46, XY, i(14)(q10)	absent	2	intermediate	int.-1	intermediate
34	72	female	RAEB-1	46, XX	present	3	high	int.-1	good
35**	76	male	RCMD	46, XY, i(17)(q10)	present	3	high	int.-1	intermediate
36	76	male	RAEB-1	46, XY, i(17)(q10)	present	4	high	int.-1	intermediate
37	82	female	RAEB-2	46, XX	absent	3	high	int.-2	good
38	66	female	RAEB-1	47, XX, +8	absent	3	high	int.-1	intermediate
39	70	male	RAEB-2	46, XY	absent	3	high		good
40	79	female	RAEB-1	46, XX	present	3	high	int.-1	good
41	69	female	RAEB-1	46, XX	present	3	high		good
42	60	female	RAEB-2	46, XX	absent	3	high		good
43	59	male	RAEB-1	46, XY	present	3	high		good
44	80	male	RCMD	46, X, -Y, +8, del(20)(q11q13)	absent	3	high	int.-2	poor
45	80	male	RCMD	46, X, -Y, +8	present	3	high		intermediate
46	77	male	RAEB-1	46, XY	present	3	high	int.-1	good
47	75	female	RAEB-1	complex	absent	4	high	int.-2	very poor
48**	57	female	RAEB-1	48, XX, +1, del(5)(q13q34), +11	absent	4	high	int.-2	poor
49**	72	female	RCMD	46, inv(10)(p11q21), del(5)(q15q32), XX,	present	3	high	int.-1	good
50	63	male	RAEB-2	46, XY	present	4	high	int.-2	good
51**	72	male	RAEB-1	46, XY, +8	present	4	high	int.-1	intermediate
52	77	male	RAEB-2	46, XY	absent	3	high		good
53	71	female	RAEB-2	46, XX	absent	3	high		good
54	65	male	RAEB-2	complex	absent	5	very high	high	very poor
55	74	male	RAEB-1	46, XY, t(17;21)(q12;q22)	present	4	high	int.-2	intermediate
56	87	male	RAEB-1	46, XY	present	3	high		good
57*	76	male	RAEB-2	46, XY	present	4	high	high	good
58*	84	male	RAEB-1	46, XY	present	3	high	int.-2	good
59**	69	male	RAEB-2	46, XY	absent	3	high	high	good
60	74	female	sAML	46, XX					good
61	85	male	sAML	48, XY, +8, +Y					intermediate
62	70	female	sAML	46, XX +X					intermediate
63	57	female	sAML	complex					very poor
64	67	male	sAML	complex					very poor
65	87	male	sAML	46, XY, del(9)(q21q34)					intermediate
66	65	male	sAML	complex					very poor
67	59	female	sAML	46, XY					good
68**	73	female	sAML	46, XX, del(5)(q22q34)					good
69	73	male	sAML	46, XY, del(7)(q22)					intermediate
70	74	male	sAML	46, XY					good
71*	78	male	sAML	47, XY, +8					intermediate
72	78	male	sAML	46, XY, i(17)(q10)					intermediate

Tabelle 1: Klinische und genetische Merkmale der MDS-/sAML-Patienten

(Alter, Geschlecht, WHO-Kategorie, Karyotyp, (Nicht-)Vorhandensein einer schweren Anämie (= Hb ♀ < 8g/dl, ♂ < 9g/dl), Bestimmung der MDS-Risikogruppe aus diesen anonymisierten Angaben entsprechend r-WPSS, IPSS und Hinzunahme des Cytogenetic Risk Scores nach Schanz et al.)

3 Ergebnisse

Um die Patientenproben unterschiedlichen Risikogruppen zuordnen zu können, wurde die WHO-Klassifikation, das IPSS, das r-WPSS und die zytogenetische Risikobewertung (Cytogenetic Risk Score) (Schanz *et al.* 2012) herangezogen (siehe auch 2.3).

Die MDS-Stamm- und Progenitorzellen befinden sich im Kompartiment der CD34⁺-Zellen (Woll *et al.* 2014). Daher wurden neben der Gesamtheit des Knochenmarkes auch die CD34⁺- Zellen im Detail untersucht (Parker *et al.* 1998).

3.1 ABT-737 zeigt keine zytotoxischen Effekte auf die gesunde Vorläuferzelle.

Durch den Einfluss von ABT-737 sollte die Funktion der gesunden Knochenmarkzellen und damit die verbliebene Hämatopoese nicht negativ beeinflusst werden.

Wichtig bei der Auswahl der gesunden Kontrollpatienten war die Alterskorrelation (Tab. 2).

	MDS	sAML	gesund
Durchschnittsalter (in Jahren)	70,7	72,3	67,1

Tabelle 2: Durchschnittsalter der eingeschlossenen Patienten

Unterteilt in MDS, sAML und gesunde Kontrolle

Hierzu wurden Hüftköpfe von alterskorrelierten Patienten verwendet, die sich einer Operation zum künstlichen Gelenkersatz unterzogen haben. Hierbei wurde sowohl die Gesamtheit aller Knochenmarkzellen, als auch die reine Population der CD34⁺-Stamm-/Progenitorzellen untersucht. Die gesunden humanen Knochenmarkzellen wurden mit ABT-737 in einer Konzentration von 1µM *in vitro* behandelt und hinsichtlich ihrer Viabilität untersucht. Weder im Ansatz der aufgereinigten Vorläuferzellen (Abb. 6A und 6B, CD34⁺), noch im unselektierten Knochenmark (Abb. 6A und 6B, total) konnte eine relevante Apoptoseinduktion durch ABT-737 festgestellt werden. Daraus kann man schließen, dass ABT-737 in MDS-Patienten verbliebene gesunde Knochenmarkzellen nicht negativ beeinflusst.

3 Ergebnisse

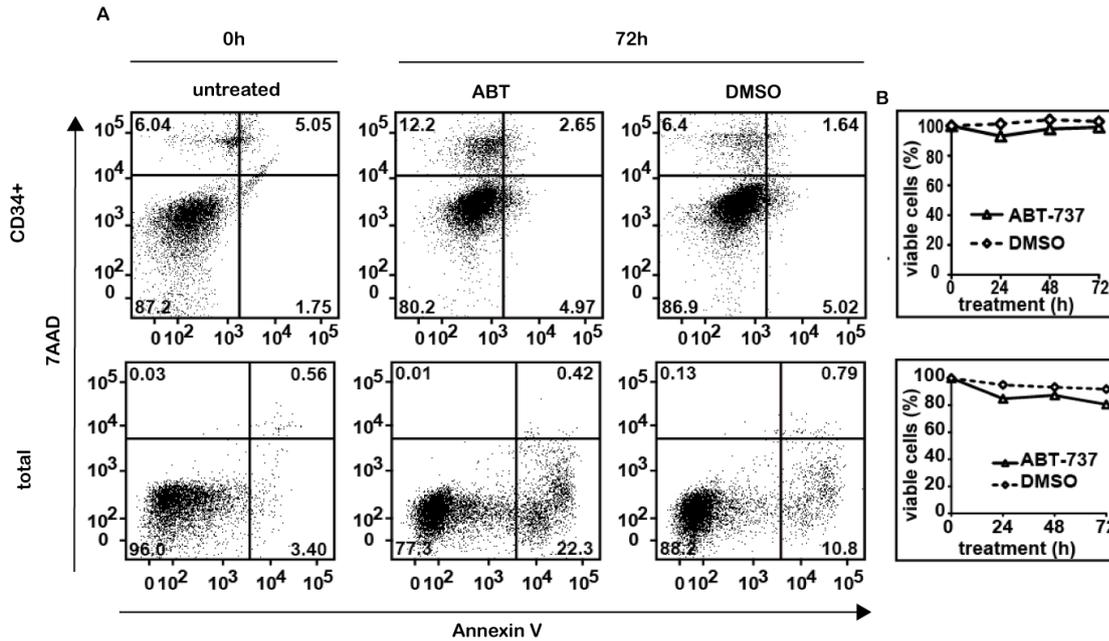


Abbildung 6: Keine relevante Apoptoseinduktion durch ABT-737 in gesunden Vorläuferzellen des Knochenmarks

(A) Darstellung der Wirkung von ABT-737 an einer individuellen alterskorrelierten gesunden Kontrollprobe unselektierten und CD34⁺-Knochenmarks. Dabei wird die Lebendigkeit zu Beginn und nach ABT-737-Behandlung und der Kontrolle (DMSO) gezeigt, Apoptose analysiert mittels Durchflusszytometrie unter Einsatz von Annexin-V und 7AAD. (B) Zeitlicher Verlauf der in (A) bestimmten Lebendigkeit einer individuellen Probe.

3.2 Effektive Apoptoseinduktion im Hochrisiko-MDS und sAML bei fehlender Apoptoseinduktion im MDS niedrigen und intermediären Risikoprofils

Die exemplarisch dargestellten MDS-Proben niedrigen und intermediären Risikoprofils werden durch die Einwirkung von ABT-737 nicht relevant hinsichtlich Apoptoseinduktion beeinflusst (Abb. 7A und 7B, low- und int.-risk).

Dagegen kann bei der Hochrisiko-MDS- und sAML-Probe eine effektive Apoptoseinduktion dargestellt werden (Abb. 7A und 7B, high-risk und sAML).

Dabei wird durch die Überwindung der in diesen Risikogruppen bereits bekannten Apoptoseresistenz eine Wirkung schon nach 24 Stunden deutlich (Abb. 7A und 7B, high-risk und sAML) (Corey *et al.* 2007, Raza and Galili 2012).

Darüberhinaus kann, wie bereits vorbeschrieben, bei der Niedrigrisiko-MDS-Probe eine im Vergleich zur Probe intermediären Risikoprofils höherer Anteil apoptotischer Zellen zu Beginn der Versuche festgestellt werden (Parker *et al.* 1998, Corey *et al.* 2007). Die MDS-Probe intermediären Risikoprofils zeigt im Vergleich zu Proben höherer Risikogruppen keine relevante Apoptose zu diesem Zeitpunkt (Abb. 7A, low- und int.-risk).

3 Ergebnisse

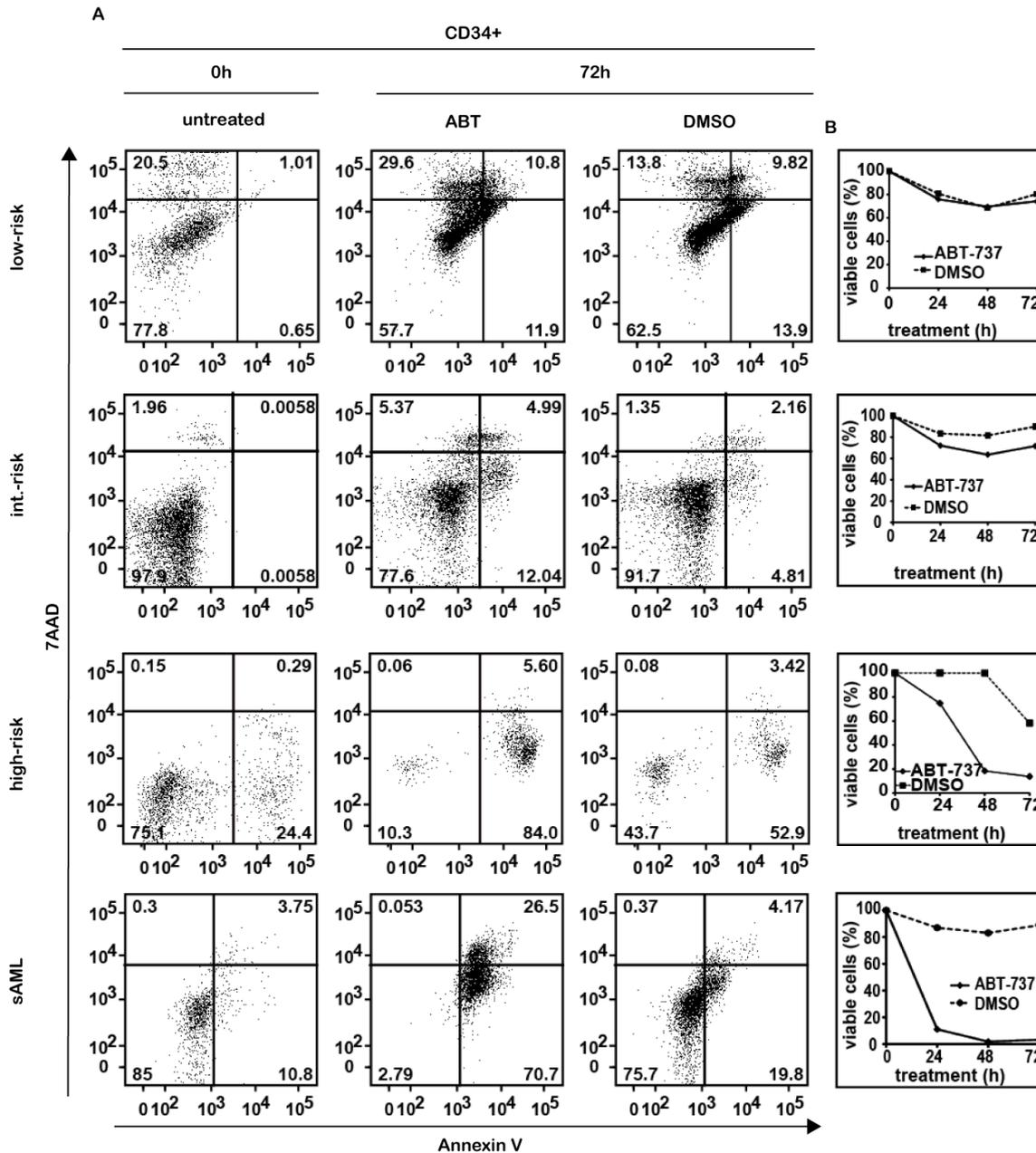


Abbildung 7: Effektive Apoptoseinduktion durch ABT-737 in Vorläuferzellen von Hochrisiko- oder sAML-Proben

(A) Darstellung der Wirkung von ABT-737 oder DMSO an einzelnen Niedrigrisiko-, intermediären, Hochrisiko- und sAML-Proben nach bestimmten Zeitpunkten, Apoptose analysiert mittels Durchflusszytometrie unter Einsatz von Annexin-V und 7AAD und auf CD34⁺-Zellen begrenzt. (B) Zeitlicher Verlauf der in (A) bestimmten Lebendigkeit individueller Proben verschiedener Risikogruppen (r-WPSS klassifiziert).

3.3 Auswirkung von ABT-737 auf Apoptoresistenz von MDS-Vorläuferzellen

In mononukleären Knochenmarkzellen von Patienten mit Hochrisiko-MDS oder sAML besteht eine ausgeprägte Apoptoresistenz (Parker *et al.* 1998, 2000, Albitar *et al.* 2002, Adams and Cory 2007). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Apoptoresistenz der Knochenmarkzellen höherer MDS-Risikogruppen durch das BH3-Mimetikum ABT-737 durchbrochen werden kann.

Es konnte eine signifikante Apoptoseinduktion in CD34⁺-Knochenmarkzellen der intermediären Risikogruppe und Hochrisiko-MDS sowie den sAML-Zellen im

3 Ergebnisse

Vergleich zur gesunden alterskorrelierten Kontrollgruppe und Niedrigrisiko-MDS festgestellt werden.

Dies war sowohl in der Risikogruppeneinteilung nach r-WPSS (Abb. 8A), als auch nach WHO-Klassifikation 2008 (Abb. 8B) nachweisbar. Die WHO-Klassifikation von 2008 orientiert sich nicht an klinischen, sondern zytogenetischen Merkmalen. Es konnte ein signifikanter Unterschied der Apoptoseinduktion zwischen den einzelnen Risikogruppen nachgewiesen werden. Lediglich zwischen RAEB-1 und RAEB-2 bestand kein signifikanter Unterschied.

Auch wenn die Proben mittels Cytogenetic Risk Score nach Schanz et al. (Abb. 8C) gruppiert wurden, konnten signifikante Unterschiede der Apoptoseinduktionsrate zwischen gesunder alterskorrelierter Kontrollgruppe, der Gruppe mit guter, mittlerer und sehr schlechter Prognose dargestellt werden.

Im IPSS (Abb. 8D) wird zusätzlich zwischen zwei intermediären Risikogruppen unterschieden (INT-1, INT-2) (Greenberg, Cox, Lebeau, *et al.* 1997). Sowohl in INT-1, als auch in INT-2 konnten im Vergleich zur gesunden alterskorrelierten Kontrollgruppe und zur Niedrigrisiko-Gruppe signifikante Unterschiede der Apoptoseinduktion festgestellt werden.

Es kann festgehalten werden, dass Hochrisiko-MDS- und sAML-Knochenmarkzellen durch eine effektive Apoptoseinduktion nach ABT-737-Gabe und Niedrigrisiko-MDS-Knochenmarkzellen durch eine fehlende relevante Apoptoseinduktion gekennzeichnet sind. Dies unterstreicht die Theorie, dass die Entstehung der Apoptoseresistenz mit dem Erkrankungsfortschritt einhergeht.

3 Ergebnisse

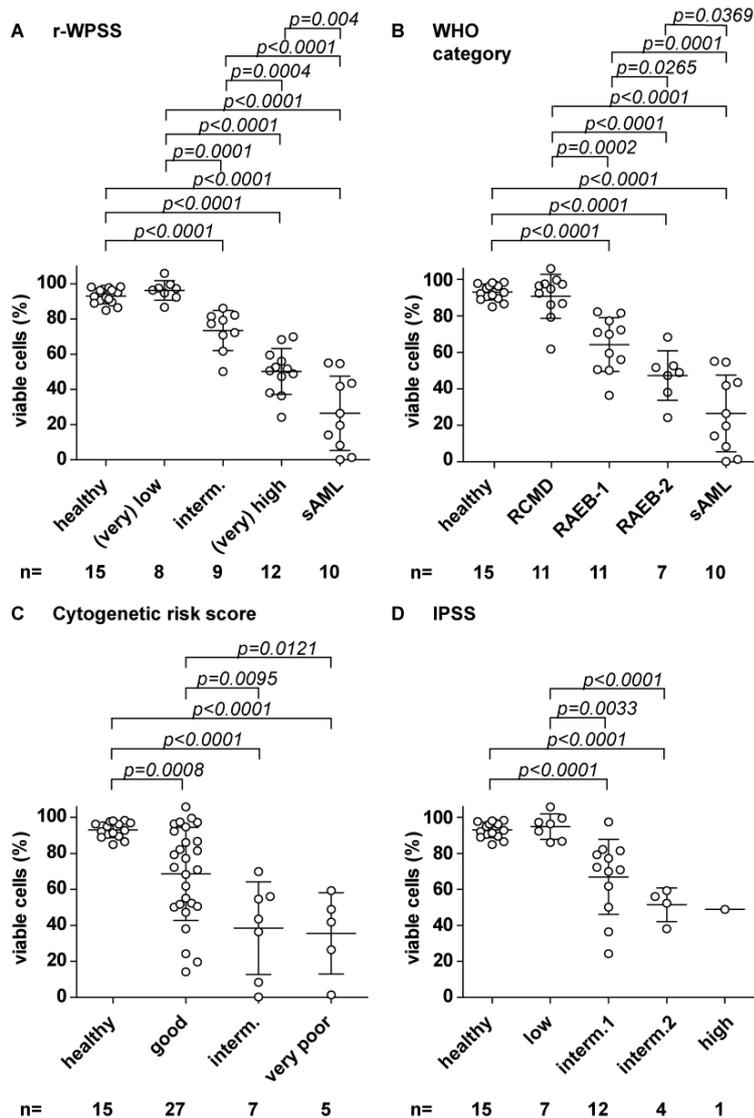


Abbildung 8: ABT-737 induziert Risikogruppen-abhängig Apoptose in CD34⁺-Vorläuferzellen des Knochenmarks.

(A) Lebendige CD34⁺-Knochenmarkszellen von 15 gesunden alterskorrelierten Kontrollen, acht Patientenproben aus der Niedrigrisiko-MDS-Patientengruppe nach r-WPSS, neun MDS-Proben intermediären Risikoprofils, zwölf aus der Hochrisiko-MDS-Patientengruppe und zehn aus der Gruppe der sAML wurden mit ABT-737 (1µm) oder DMSO als Kontrolle behandelt. Jeder Kreis stellt das Verhältnis der Anteile lebendiger Zellen nach 72h-Behandlung mit ABT-737 und DMSO dar. Die Apoptoseanalyse erfolgte wie in Abb. 6 und 7 gezeigt. Der p-Wert ist der Abbildung direkt zu entnehmen. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. (B) Lebendige CD34⁺-Knochenmarkszellen von 15 gesunden alterskorrelierten Kontrollen, elf Patientenproben mit refraktärer Zytopenie mit multilineären Dysplasien (RCMD) nach WHO-Klassifikation, elf mit refraktärer Anämie mit Blastenüberschuss <10% (RAEB-1), sieben mit refraktärer Anämie mit Blastenüberschuss >10% (RAEB-2) und zehn aus der Gruppe der sAML wurden mit ABT-737 (1µm) oder DMSO als Kontrolle behandelt. Bedeutung des Kreises, Apoptoseanalyse und Fehlerbalken wie gehabt. (C) Lebendige CD34⁺-Knochenmarkszellen von 15 gesunden alterskorrelierten Kontrollen, 27 Patientenproben mit guter Prognose (good), sieben mit intermediärer Prognose (interm.) und fünf mit sehr schlechter Prognose (very poor), eingeteilt nach dem Cytogenetic Risk Score nach Schanz et al. wurden mit ABT-737 (1µm) oder DMSO als Kontrolle behandelt. Bedeutung des Kreises, Apoptoseanalyse und Fehlerbalken wie gehabt. (D) Lebendige CD34⁺-Knochenmarkszellen von 15 gesunden alterskorrelierten Kontrollen, sieben Patientenproben aus der Niedrigrisiko-MDS-Patientengruppe nach IPSS, zwölf MDS-Proben intermediären Risikoprofils (Untergruppe 1), vier MDS-Proben intermediären Risikoprofils (Untergruppe 2) und eine aus der Hochrisiko-MDS-Patientengruppe wurden mit ABT-737 (1µm) oder DMSO als Kontrolle behandelt. Bedeutung des Kreises, Apoptoseanalyse und Fehlerbalken wie gehabt.

3 Ergebnisse

Um auch die Auswirkungen des BH3-Mimetikums ABT-737 auf differenziertere Zellen des Knochenmarks abschätzen zu können, wurde die komplette Zellpopulation der Probe, und nicht mehr nur die CD34⁺-Subpopulation, hinsichtlich der Apoptoseinduktion durch ABT-737 untersucht. Das Ergebnis ist im Vergleich zu CD34⁺-Knochenmarkzellen eine minimal geringere Potenz der Apoptoseinduktion (Abb. 9). Allerdings bestehen trotzdem signifikante Unterschiede zwischen Niedrigrisiko-MDS-Proben und MDS-Proben intermediären Risikoprofils verglichen mit Hochrisiko-MDS- oder sAML-Proben (nach r-WPSS, WHO-Klassifikation und IPSS). Bei der Analyse der verschiedenen Risikogruppen des Cytogenetic Risk Scores nach Schanz et al. konnten signifikante Unterschiede nur zwischen gesunden alterskorrelierten Kontrollen und den MDS-Proben, allerdings nicht unter den verschiedenen Prognosegruppen nachgewiesen werden.

Das Ausmaß der Apoptoseinduktion in der CD34⁺-Subpopulation des Knochenmarks hängt von der Risikogruppe ab: je höher die Risikogruppe, desto effektiver die Apoptoseinduktion durch ABT-737, vor allem in Hochrisiko-MDS- und sAML-Knochenmarkzellen.

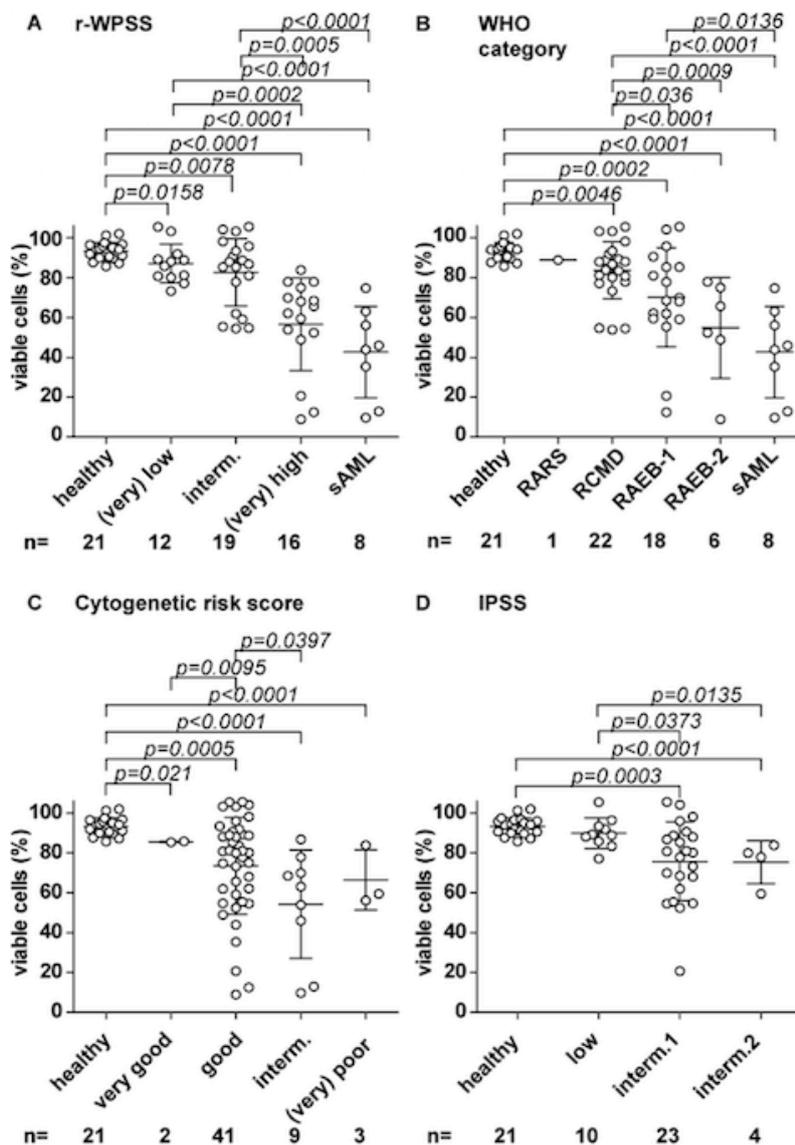


Abbildung 9: ABT-737 induziert Risikogruppen-abhängig Apoptose auch in differenzierteren MDS-Knochenmarkzellen.

(A) Unaufgereinigte Knochenmarkzellen (BMMNC, für *bone marrow mononuclear cells*) von 21 gesunden alterskorrelierten Kontrollen, zwölf Patientenproben aus der Niedrigrisiko-MDS-

3 Ergebnisse

Patientengruppe nach r-WPSS, 19 MDS-Proben intermediären Risikoprofils, 16 aus der Hochrisiko-MDS-Patientengruppe und acht aus der Gruppe der sAML wurden mit ABT-737 (1µm) oder DMSO als Kontrolle behandelt. Jeder Kreis stellt das Verhältnis der Anteile lebendiger Zellen nach 72h-Behandlung mit ABT-737 und DMSO dar. Die Apoptoseanalyse erfolgte wie in Abb. 6 und 7 gezeigt. Der p-Wert ist der Abbildung direkt zu entnehmen. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. **(B)** Unaufgereinigte BMMNC von 21 gesunden alterskorrelierten Kontrollen, eine Patientenprobe mit refraktärer Zytopenie mit Ringsideroblasten (RARS) nach WHO-Klassifikation, 22 Patientenproben mit refraktärer Anämie mit multilineären Dysplasien (RCMD), 18 mit refraktärer Anämie mit Blastenüberschuss <10% (RAEB-1), sechs mit refraktärer Anämie mit Blastenüberschuss >10% (RAEB-2) und acht aus der Gruppe der sAML wurden mit ABT-737 (1µm) oder DMSO als Kontrolle behandelt. Bedeutung des Kreises, Apoptoseanalyse und Fehlerbalken wie gehabt. **(C)** Unaufgereinigte BMMNC von 21 gesunden alterskorrelierten Kontrollen, zwei Patientenproben mit sehr guter Prognose (very good), 41 Patientenproben mit guter Prognose (good), neun mit intermediärer Prognose (interm.) und drei mit (sehr) schlechter Prognose ((very) poor), eingeteilt nach dem Cytogenetic Risk Score nach Schanz et al. wurden mit ABT-737 (1µm) oder DMSO als Kontrolle behandelt. Bedeutung des Kreises, Apoptoseanalyse und Fehlerbalken wie gehabt. **(D)** Unaufgereinigte BMMNC von 21 gesunden alterskorrelierten Kontrollen, zehn Patientenproben aus der Niedrigrisiko-MDS-Patientengruppe nach IPSS, 23 MDS-Proben intermediären Risikoprofils (Untergruppe 1) und vier MDS-Proben intermediären Risikoprofils (Untergruppe 2) wurden mit ABT-737 (1µm) oder DMSO als Kontrolle behandelt. Bedeutung des Kreises, Apoptoseanalyse und Fehlerbalken wie gehabt.

3.4 Einfluss von ABT-737 auf Apoptose Kolonie-bildender Vorläuferzellen

MDS ist eine klonale Erkrankung, die durch die Transformation einer hämatopoetischen Stammzelle entsteht (Jaiswal and Ebert 2014, Woll *et al.* 2014). Deshalb ist zur Entwicklung einer effektiven Therapie entscheidend, das betroffene Stammzell-Kompartiment gezielt behandeln zu können.

Es wurde folglich untersucht, ob ABT-737 einen Einfluss auf die Kolonie-bildenden Vorläuferzellen des Knochenmarks hat.

Nach 72h-In-Kulturnahme der CD34⁺-MDS-Knochenmarkzellen mit ABT-737 wurden diese ohne weitere Zugabe von ABT-737 in mit Wachstumsfaktoren angereicherte Methylcellulose überführt und in dieser 14 Tage inkubiert. Bei der anschließenden Auszählung werden unterschiedliche Kolonietypen erfasst. Es wird zwischen CFU-GM (Abb. 5B, für Colony Forming Unit – Granulocytes and Macrophages), CFU-GEMM (Abb. 5C, für Colony Forming Unit – Granulocytes, Erythrocytes, Macrophages and Megacaryocytes) und BFU-E (Abb. 5A, für Erythroid Burst Forming Unit) unterschieden. Es wurde untersucht, ob ABT-737 einen Einfluss auf die Koloniebildung der CD34⁺-Zellen hat. In den Hochrisiko-MDS-Proben konnte den Ergebnissen der oben beschriebenen Versuche entsprechend eine deutliche Verminderung der Koloniezahl durch das BH3-Mimetikum beobachtet werden (Abb. 10D). Dagegen blieben, wie ebenfalls schon festgestellt, die Koloniezahlen in der Niedrigrisiko-Gruppe und in MDS-Proben intermediären Risikoprofils annähernd gleich (Abb. 10B und 10C). Der angegebene p-Wert zu den Koloniezahlen bei den Hochrisiko-MDS-Proben mit und ohne ABT-737 ist trotz klar ersichtlichem Unterschied wegen der geringen Probenzahl (n=2) nicht signifikant.

3 Ergebnisse

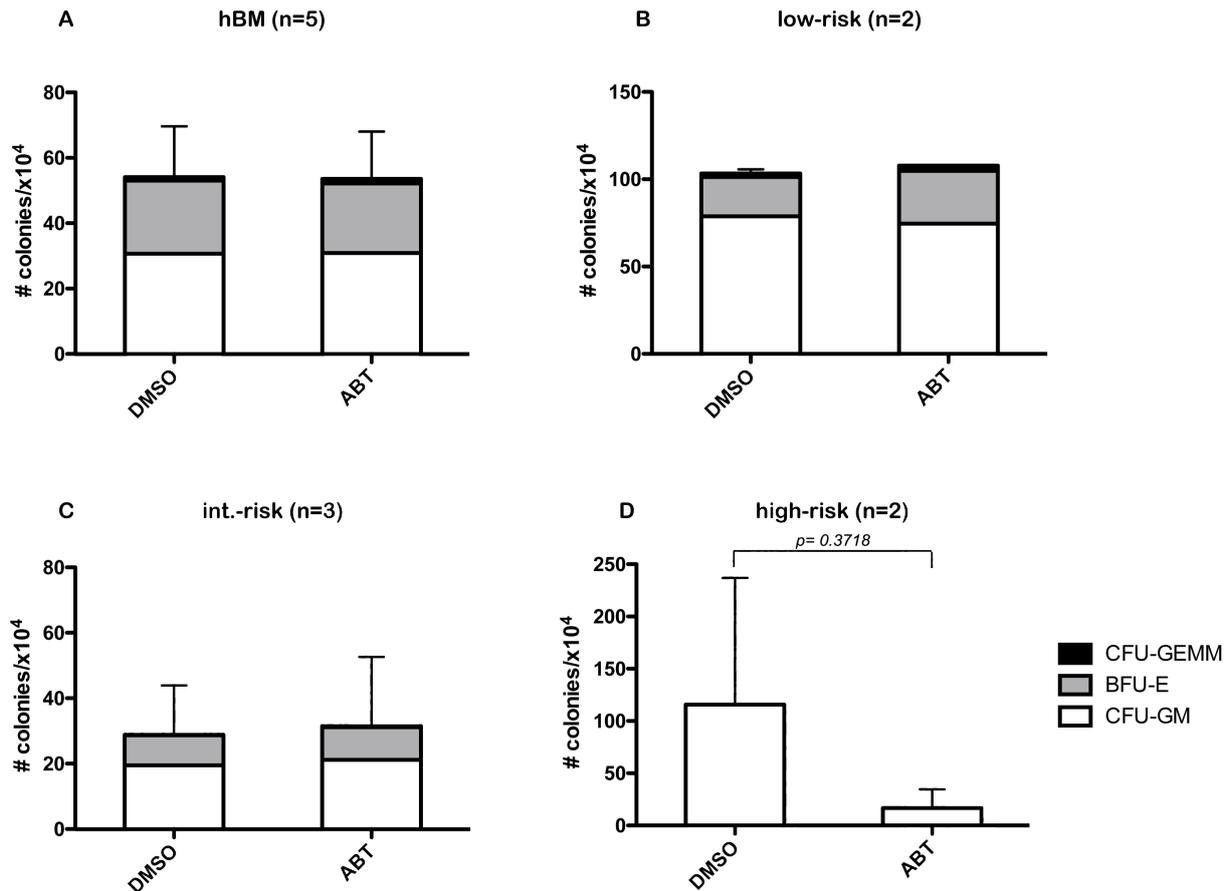


Abbildung 10: ABT-737 reduziert effektiv die Koloniebildung der Vorläuferzellen von Hochrisiko-MDS-Patientenproben, nicht aber der gesunden oder Knochenmarkzellen niedrigeren Risikoprofils.

(A) 1×10^4 Knochenmarkzellen gesunder Probanden wurden nach 72h-In-Kulturnahme mit ABT-737 ($1 \mu\text{m}$) oder DMSO (als Kontrolle) in mit Wachstumsfaktoren angereicherte Methylcellulose überführt. Nach 14 Tagen wurden die Colony Forming Units (CFU) ausgezählt. Es wurde zwischen CFU-GEMM (GEMM für Granulocytes, Erythrocytes, Macrophages und Megacaryocytes), CFU-GM (GM für Granulocytes, Macrophages) und BFU-E (für Erythroid Burst Forming Units) unterschieden. Dargestellt ist der Mittelwert der Gesamtkoloniezahl als aufgeteiltes Balkendiagramm mit darin enthaltenen Einzelkoloniezahlen mit dargestellter Probenanzahl pro Gruppe. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. p-Wert in der Abbildung ersichtlich. (B) 1×10^4 Knochenmarkzellen aus einer Niedrigrisiko-MDS-Probe (eingeteilt nach r-WPSS) wurden nach 72h-In-Kulturnahme mit ABT-737 ($1 \mu\text{m}$) oder DMSO (als Kontrolle) in mit Wachstumsfaktoren angereicherte Methylcellulose überführt. Prozedere und Statistik wie gehabt. (C) 1×10^4 Knochenmarkzellen aus einer MDS-Probe intermediären Risikos (eingeteilt nach r-WPSS) wurden nach 72h-In-Kulturnahme mit ABT-737 ($1 \mu\text{m}$) oder DMSO (als Kontrolle) in mit Wachstumsfaktoren angereicherte Methylcellulose überführt. Prozedere und Statistik wie gehabt. (D) 1×10^4 Knochenmarkzellen aus einer Hochrisiko-MDS-Patientenprobe (eingeteilt nach r-WPSS) wurden nach 72h-In-Kulturnahme mit ABT-737 ($1 \mu\text{m}$) oder DMSO (als Kontrolle) in mit Wachstumsfaktoren angereicherte Methylcellulose überführt. Prozedere und Statistik wie gehabt, obwohl die Probenanzahl mit $n=2$ nie zu einem überzeugenden P-Wert führen würde. Alle Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt.

Durch ABT-737 konnte in gesunden Knochenmarkzellen kein Einfluss auf die Koloniebildung genommen werden, die Koloniezahlen sind ident (Abb. 10A).

Die Untersuchungen bestätigen die bisherigen Ergebnisse. ABT-737 induziert Risikogruppen-abhängig Apoptose in MDS-Vorläuferzellen des Knochenmarks, gesunde Knochenmarkzellen werden nicht negativ beeinflusst.

Allerdings liegt auf Grund der kleinen Anzahl an untersuchten Proben keine statistische Signifikanz vor. Die Ergebnisse wurden aber in weiterführenden

3 Ergebnisse

Analysen der Arbeitsgruppe in einem größeren Patientenkollektiv bestätigt (Jilg *et al.* 2015).

3.5 Effekt der Stromaprotektion auf die Apoptoseinduktion durch ABT-737

Die enge Interaktion zwischen hämatopoetischer Stamm- bzw. Vorläuferzelle und mesenchymalen Stromazellen spielt eine zentrale Rolle im MDS (Calvi *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2003, Raaijmakers and Scadden 2008). Um diese Interaktion in die Untersuchung der Wirkung des BH3-Mimetikums ABT-737 miteinzubeziehen, wurden die CD34⁺-MDS-Knochenmarkzellen mit der murinen Stromazelllinie EL08-1D2 co-kultiviert.

Es wurde gezeigt, dass auch murine Stromazellen Einfluss auf humane Knochenmarkzellen haben, unter anderem bei der embryonalen Stammzellendifferenzierung und hinsichtlich eines positiven Einflusses des Überlebens *in vitro* (Oostendorp *et al.* 2002, Ledran *et al.* 2008).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Stromazellen MDS-Hochrisiko- und sAML-Knochenmarkzellen nur in sehr geringem Maße vor der Apoptoseinduktion durch ABT-737 schützen können. In Hochrisiko-MDS-/sAML-Proben konnte im Vergleich zu gesunden alterskorrelierten Kontrollen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Stromazellen eine signifikante Apoptoseinduktion nachgewiesen werden (Abb. 11A, mean high-risk/sAML: 54,98%, Abb. 8, mean high-risk/sAML: 50,32%). Auch die Koloniebildungsfähigkeit der Vorläuferzellen ist trotz Co-Kultur mit Stromazellen signifikant reduziert (Abb. 11B).

ABT-737 hat darüberhinaus keinen schädigenden Einfluss auf die murinen Stromazellen selbst und beeinträchtigt deren Funktion nicht. Es konnte keine relevante Apoptoseinduktion in Stromazellen selbst festgestellt werden (Abb. 11C).

3 Ergebnisse

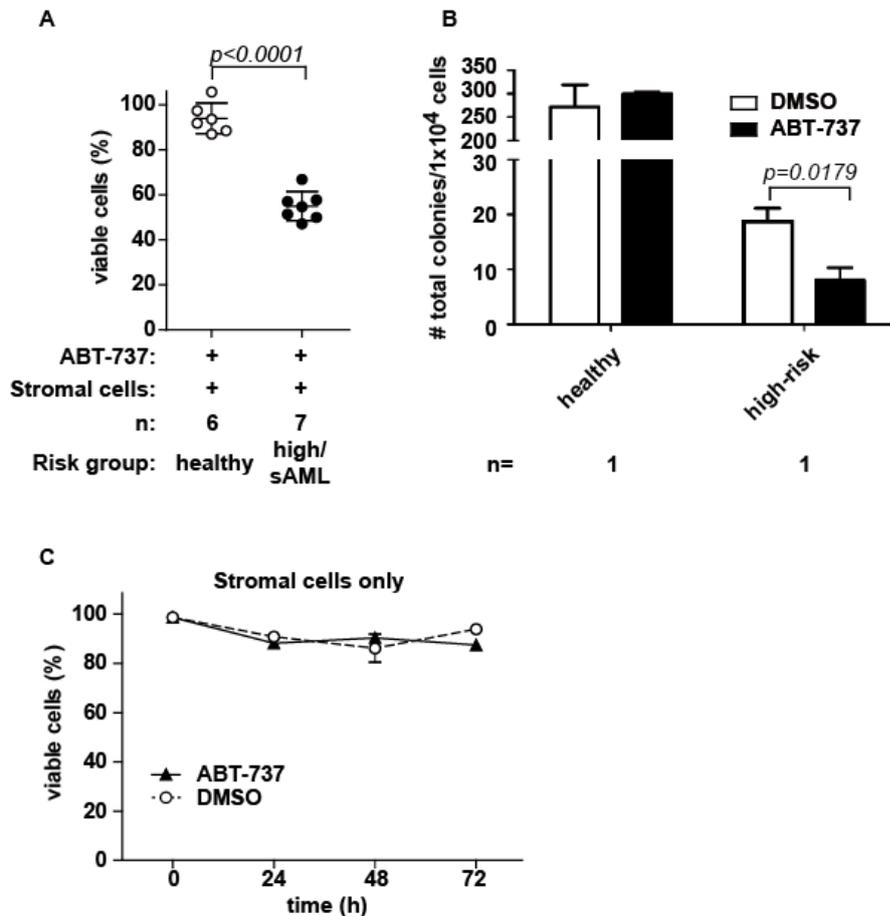


Abbildung 11: Stromazellen vermindern den Effekt der Apoptoseinduktion durch ABT-737 auf Knochenmarkszellen des Hochrisiko-MDS nur leicht.

(A) CD34⁺-Knochenmarkszellen von sechs gesunden alterskorrelierten Kontrollproben und sieben Hochrisiko-MDS- bzw. sAML-Patientenproben wurden in Anwesenheit von Stromazellen der Zelllinie EL08-1D2 mit ABT-737 oder DMSO (als Kontrolle) in Kultur genommen. Wie in Abb. 9 stellen die Kreise das Verhältnis der Anteile lebendiger Zellen nach 72h-Behandlung mit ABT-737 und DMSO dar. Die Apoptoseanalyse erfolgte wie in Abb. 6 und 7 gezeigt. Der p-Wert ist der Abbildung direkt zu entnehmen. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung. (B) Nach 72h-Inkulturnahme der CD34⁺-Knochenmarkszellen einer gesunden alterskorrelierten Kontrollprobe und einer Hochrisiko-MDS-Probe, beides in Anwesenheit der Stromazellen der Zelllinie EL08-1D2, wurden 1x10⁴ Zellen, dann ohne Stromazellen und ABT-737 in mit Wachstumsfaktoren angereicherte Methylcellulose überführt. Nach 14 Tagen werden die Colony Forming Units (CFU) ausgezählt. Dargestellt ist der Mittelwert der Gesamtkoloniezahl als Balkendiagramm. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. P-Wert in der Abbildung ersichtlich. (C) Lebendigkeit der Stromazellen allein nach Behandlung mit ABT-737 (1µm) und DMSO (als Kontrolle) über 72 Stunden. Die Lebendigkeit der Zellen wird dabei durch das Verhältnis der lebenden Zellen zu Beginn des Experiments und dann im Vergleich zur alterskorrelierten Kontrolle im Verlauf angezeigt. Das Experiment wurde in Triplikaten angelegt und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ABT-737 trotz Stromazellprotektion eine effiziente Apoptoseinduktion in Hochrisiko-MDS-/sAML-Knochenmarkszellen bewirkt.

4 Diskussion

Die Veränderung der Apoptoseregulation ist ein Hauptmerkmal des MDS, die Apoptoseresistenz ein Kennzeichen der höheren Risikogruppen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das BH3-Mimetikum ABT-737 effektiv Apoptose in Knochenmarkszellen von Patienten mit Hochrisiko-MDS und sAML *in vitro* induziert.

4.1 „Hochrisiko“ als Prädiktor für Therapieansprechen des BH3-Mimetikums ABT-737

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Status „Hochrisiko“ eines MDS-Patienten das Ansprechen auf die Gabe eines BH3-Mimetikums wie ABT-737 wahrscheinlich macht.

Unabhängig davon, welches der Klassifikationssysteme für die Einteilung verwendet wurde, stand das Merkmal „Hochrisiko“ oder sAML für ein gutes Ansprechen auf die Behandlung mit dem BH3-Mimetikum ABT-737.

Sowohl Patientenproben zur Erstdiagnose, nach Beginn der Erstlinientherapie und nach Therapieversagen wurden eingeschlossen. Dass das Ansprechen der Zellen auf ABT-737 innerhalb der Risikogruppen ähnlich war, deutet an, dass die mögliche Vorbehandlung des Patienten und der Krankheitsverlauf eine eher untergeordnete Rolle spielen. Dagegen könnte eher ein Aspekt wie das mitochondriale Priming (s.u.) die Effektivität eines Einsatzes der Apoptose-induzierenden Substanzen beeinflussen, als die Vorgeschichte des Patienten.

4.2 Die MDS-Vorläuferzelle und deren Beeinflussbarkeit durch ABT-737

In unseren *in-vitro*-Versuchen konnten wir zeigen, dass durch das BH3-Mimetikum ABT-737 eine effektive Apoptoseinduktion in CD34⁺-Knochenmarkszellen des Hochrisiko-MDS und der sAML möglich ist. Dies wird durch die Reaktivierung der mitochondrialen Apoptose durch Inhibition anti-apoptotischer Vertreter der Bcl-2-Proteinfamilie möglich.

Wir schlussfolgern auch, dass das BH3-Mimetikum ABT-737 die Ursprungszelle des MDS gezielt angreifen kann. In der Langzeitkultur von CD34⁺-Knochenmarkszellen konnte eine Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit der Hochrisiko-MDS-Zellen beobachtet werden.

Daraus kann man schließen, dass ABT-737 die im CD34⁺-Kompartiment des Knochenmarks befindliche Ursprungszelle des MDS gezielt beeinflussen kann, was durch die Erkenntnis der Existenz dieser Zelle durch vorangehende Untersuchungen einen notwendigen Schritt darstellt (Woll *et al.* 2014).

Im Mausmodell war es bereits möglich durch ABT-737 leukämische Vorläuferzellen zu beeinflussen und dadurch das Überleben der Mäuse zu verlängern (Beurlet *et al.* 2013).

Die fehlende Signifikanz der Koloniebildungsreduktion im Hochrisiko-MDS in der Langzeitkultur ist durch die zu geringe Probenanzahl bedingt. In weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe in einem größeren Patientenkollektiv konnte dies erreicht werden (Jilg *et al.* 2015).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der Effekt der Wirkstoffe ABT-737 und ABT-199 auf gesunde Knochenmarkszellen. Es konnte gezeigt werden, dass weder in gesunden CD34⁺-, noch in gesunden unselektierten Knochenmarkszellen relevant Apoptose

4 Diskussion

induziert wird. Die Wirkstoffe könnten also in MDS-Patienten ohne erwartbaren Schaden der gesunden Knochenmarkzellen eingesetzt werden.

Eine ähnliche Frage stellte sich hinsichtlich differenzierter Zellen des Knochenmarks im MDS. Es konnte zwar eine minimal geringere Effektivität der Apoptoseinduktion im Vergleich zum CD34⁺-Knochenmark gezeigt werden, allerdings weiterhin signifikante Unterschiede zwischen Knochenmarkzellen niedrigeren und intermediären Risikoprofils zu den Hochrisiko-Knochenmarksproben. Dies trägt dazu bei, dass die bereits reduzierte physiologische Funktion des Knochenmarks eines MDS-Patienten nicht noch weiter eingeschränkt wird.

4.3 Klinische Transition der Zellkulturergebnisse

Die Bcl-2-Überexpression hat einen Einfluss auf das schlechtere Ansprechen einer Chemotherapie beim Multiplen Myelom, dem MDS, der AML, der ALL, dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom, dem Follikulären Lymphom und der CLL (Khan and Kahl 2018)

ABT-737 war der erste Wirkstoff, der Bcl-2 antagonisieren konnte. Es zeigt nicht nur in MDS-*in-vitro*-Versuchen eine gute Wirksamkeit und hemmt sowohl Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-W (Oltersdorf *et al.* 2005). Allerdings ist ABT-737 nicht oral verfügbar. Das oral verfügbare Pendant zu ABT-737 stellt ABT-263 (auch Navitoclax) dar. Es wurden Ergebnisse aus präklinischen Studien veröffentlicht, allerdings löste es unerwünschte Thrombozytopenien aus. Diese sind durch die Bindung an Bcl-xL und Inhibition desselben begründet, welches in Vorläufern der Blutplättchen exprimiert wird (Rudin *et al.* 2012, Kaefer *et al.* 2014).

Mit ABT-199 (auch Venetoclax) ist ein selektiver Bcl-2-Inhibitor auch oral verfügbar. Es bindet mit 100-fach höherer Affinität an Bcl-2 als an andere Bcl-2-Proteine (Zhu and Almasan 2017) und besitzt deshalb ein günstigeres Nebenwirkungsprofil (Mihalyova *et al.* 2018).

Es ist bereits in der Therapie der Rezidiv-CLL für die klinische Verwendung zugelassen (Wierda *et al.* 2017) und könnte als Kombinationstherapie mit Rituximab eine endgültige Therapieoption dieser Erkrankung darstellen (unveröffentlicht, MURANO Trial, ASH 2017).

Da bisher für ältere Patienten über 75 Jahre mit schwereren Komorbiditäten noch keine aussichtsreiche Therapieoption besteht, ist die weitere Entwicklung einer zielgerichteten Therapie mit günstigem Nebenwirkungsprofil dringend notwendig (Medeiros *et al.* 2015).

Venetoclax zeigt *in vitro* eine gute Wirksamkeit im Hochrisiko-MDS (Jilg *et al.* 2015) und wird für Patienten mit AML- oder MDS-Rezidiv schon eingesetzt (DiNardo *et al.* 2018).

ABT-199 zeigte trotz ungünstiger Mutationsprofile Apoptose-relevanter Gene der Hochrisiko-MDS-Patienten wie *TP53* oder *RUNX1*, aber auch *ASXL1* oder *EZH2* eine effektive Apoptoseinduktion *in vitro* (Reidel *et al.* 2018).

4.4 Mcl-1 als Hauptresistenzfaktor einer auf Bcl-2 zielgerichteten Therapie

Ein fehlendes Ansprechen auf ABT-737 bzw. im klinischen Setting eher ABT-199/Venetoclax kann durch eine vermehrte Expression des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins Mcl-1, aber auch Bcl-xL erklärt werden (Bogenberger *et al.* 2014, Choudhary *et al.* 2015, Jilg *et al.* 2015, Punnoose *et al.* 2016). Im Niedrigrisiko-MDS konnte ohnehin ein höheres Expressionslevel detektiert werden (Jilg *et al.* 2015). Vereinzelt, ABT-737/-199-unempfindliche Hochrisiko-MDS-Proben zeigten allerdings ebenfalls erhöhte Expressionslevel von Mcl-1 (Jilg *et al.* 2015).

4 Diskussion

Zum einen könnte die Konsequenz dieser Erkenntnisse sein, dass Patienten vor Therapiebeginn hinsichtlich der Mcl-1-Expression untersucht werden könnten, um die Anwendung eines selektiven Bcl-2-Inhibitors zu hinterfragen (Jilg *et al.* 2015). Zum anderen könnte eine Kombinationstherapie aus Venetoclax und einem auf Mcl-1-wirkenden Agens diesen Erkenntnissen begegnen. Der small molecule Mcl-1-Inhibitor S63845 konnte bereits *in vivo* eine effektive Therapiealternative darstellen und könnte für eine Kombinationstherapie mit Venetoclax in Betracht gezogen werden (Kotschy *et al.* 2016). Auch ein CDK-Inhibitor (cyclin-dependent kinase) könnte dieser Situation begegnen, da es die Mcl-1-Level senken konnte (Bogenberger *et al.* 2017, Zhou *et al.* 2018) und sollte weiter untersucht werden.

4.5 Mitochondriales Priming

Wie bereits in AML-Knochenmarkzellen gezeigt, könnte das Ansprechen auf einen pro-apoptotischen Reiz einen prädiktiven Wert für die Effektivität einer Therapie darstellen (Vo *et al.* 2013). Das BH3-Profilung, also die Einstufung des Apoptosepotentials von Zellen nach Zugabe eines synthetischen BH3-only Proteins, gilt dabei als Grundlage und das Ergebnis ist die Bewertung des mitochondrialen Primings (Vo *et al.* 2013). Je empfänglicher bzw. besser geprimed AML-Knochenmarkzellen sind, desto wahrscheinlicher ist ein Therapieerfolg (Chonghaile *et al.* 2011). Die Tatsache, dass ein MDS-Patient als „Hochrisiko“ eingestuft wird, könnte mit dem Merkmal „mitochondriales Priming“ einer AML-Zelle einhergehen, da im Hochrisiko-MDS und sAML-Zellen die Wirkung des BH3-Mimetikums ABT-737 und des selektiven Bcl-2-Inhibitors ABT-199 gemessen an der Apoptoseinduktion am höchsten war (Jilg *et al.* 2015).

5 Zusammenfassung

Die Myelodysplastischen Syndrome gehören zu den häufigsten malignen Erkrankungen des Knochenmarks des älteren Menschen (Ma *et al.* 2007). Ein zentrales Merkmal ist die deregulierte Apoptose. Im Niedrigrisiko-MDS ist eine erhöhte Apoptoserate charakteristisch. Dagegen zeigt sich im Hochrisiko-MDS eine zunehmende Apoptoseresistenz.

Die Therapie richtet sich nach der Risikogruppe und beinhaltet neben supportiven Maßnahmen hypomethylierende Substanzen wie 5-Azacidine. Die allogene Stammzelltransplantation stellt den einzig kurativen Therapieansatz dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Apoptoseinduktion durch das BH3-Mimetikum ABT-737 im MDS und sAML untersucht. Das Augenmerk lag auf der Untersuchung der Einwirkung von ABT-737 auf CD34⁺-Vorläuferzellen, die als Ursprungszellen des MDS gelten.

Es wurden insgesamt 59 MDS-Proben unterschiedlicher Risikogruppen, 13 sAML-Proben und 15 gesunde alterskorrelierte Kontrollen analysiert.

Das BH3-Mimetikum ABT-737 hat bei einer Konzentration von 1µM keinen zytotoxischen bzw. Apoptose-induzierenden Effekt auf Knochenmarkzellen gesunder alterskorrelierter Kontrollen und Zellen des Niedrigrisiko-MDS.

Im Hochrisiko-MDS konnte eine deutliche Apoptoseinduktion durch die Einwirkung von ABT-737 in den Knochenmarkzellen gezeigt werden.

Gesondert betrachtet wurde der Effekt auf Kolonie-bildende Vorläuferzellen. Hier zeigte sich eine deutliche Reduktion der Koloniebildung durch ABT-737 im Hochrisiko-MDS.

Um die physiologischen Bedingungen im Knochenmark besser abbilden zu können, wurde untersucht, ob Stromazellen einen Einfluss auf die Wirkung von ABT-737 in Hochrisiko-MDS-/sAML-Knochenmarkzellen haben. Es konnte gezeigt werden, dass nur ein geringer Einfluss besteht. Die Apoptoseinduktion durch ABT-737 erfolgte weiterhin in signifikantem Ausmaß.

Diese Arbeit zeigt, dass das BH3-Mimetikum ABT-737 *in vitro* die Apoptoseresistenz von Hochrisiko-MDS-Knochenmarkzellen wirkungsvoll durchbrechen kann.

Weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass der selektive Bcl-2-Inhibitor ABT-199 eine ähnliche Apoptoseinduktion in Hochrisiko-MDS- und sAML-Knochenmarkzellen erreicht und dies unabhängig vom Mutationsprofil Apoptose-relevanter Gene ist.

ABT-199 könnte als selektiver Bcl-2-Inhibitor und mit bereits bestehender Zulassung bei der CLL-Therapie eine Erweiterung der Therapiealternativen in der Primärtherapie des MDS darstellen, da es in ersten klinischen Studien Wirksamkeit in der Therapie von AML- und MDS-Rezidiven gezeigt hat.

Weiterentwicklungen in der Diagnostik und Risikoeinstufung der Patienten im Sinne der Einbeziehung des mitochondrialen Primings und eine parallele Berücksichtigung der Mcl-1-Level beim Einsatz der oben beschriebenen Therapeutika sollten weiter untersucht werden.

Teile dieser Arbeit konnten im Journal *Leukemia* publiziert werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, J.M. and Cory, S., 1998. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*, 281 (1998), 1322–1326.
- Adams, J.M. and Cory, S., 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26 (9), 1324–37.
- Aggarwal, B.B., Gupta, S.C., and Kim, J.H., 2012. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*.
- Albitar, M., Manshouri, T., Shen, Y., Liu, D., Beran, M., Kantarjian, H.M., Rogers, A., Jilani, I., Lin, C.W., Pierce, S., Freireich, E.J., and Estey, E.H., 2002. Myelodysplastic syndrome is not merely “preleukemia.” *Blood*, 100 (3), 791–798.
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M., and Vardiman, J.W., 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*.
- Bejar, R., Lord, A., Stevenson, K., Bar-Natan, M., Pérez-Ladaga, A., Zaneveld, J., Wang, H., Caughey, B., Stojanov, P., Getz, G., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Chen, R., Stone, R.M., Neuberg, D., Steensma, D.P., and Ebert, B.L., 2014. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. *Blood*.
- Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B.B., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Raza, A., Levine, R.L., Neuberg, D., Ebert, B.L., Ph, D., Nilsson, B.B., Ph, D., Garcia-Manero, G., Neuberg, D., Sc, D., Ebert, B.L., and Ph, D., 2011. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *The New England journal of medicine*.
- Berghe, T. Vanden, Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C.J., Brunk, U.T., Declercq, W., and Vandenabeele, P., 2010. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death and Differentiation*.
- Beurlet, S., Omidvar, N., Gorombeï, P., Krief, P., Le Pogam, C., Setterblad, N., de la Grange, P., Leboeuf, C., Janin, A., Noguera, M.-E., Hervatin, F., Sarda-Mantel, L., Konopleva, M., Andreeff, M., Tu, A.W., Fan, A.C., Felsher, D.W., Whetton, A., Pla, M., West, R., Fenaux, P., Chomienne, C., and Padua, R.A., 2013. BCL-2 inhibition with ABT-737 prolongs survival in an NRAS/BCL-2 mouse model of AML by targeting primitive LSK and progenitor cells. *Blood*, 122 (16), 2864–2876.
- Bogdanović, A.D., Trpinac, D.P., Janković, G.M., Bumbasirević, V.Z., Obradović, M., and Colović, M.D., 1997. Incidence and role of apoptosis in myelodysplastic syndrome: morphological and ultrastructural assessment. *Leukemia*, 11 (5), 656–659.
- Bogenberger, J., Whatcott, C., Hansen, N., Delman, D., Shi, C.-X., Kim, W., Haws, H., Soh, K., Lee, Y.S., Peterson, P., Siddiqui-Jain, A., Weitman, S., Stewart, K., Bearss, D., Mesa, R., Warner, S., and Tibes, R., 2017. Combined venetoclax and alvocidib in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 8 (63), 107206–107222.
- Bogenberger, J.M., Kornblau, S.M., Pierceall, W.E., Lena, R., Chow, D., Shi, C., Mantei, J., Ahmann, G., Gonzales, I.M., and Choudhary, A., 2014. BCL-2 family proteins as 5-Azacytidine-sensitizing targets and determinants of response in myeloid malignancies, 28 (8), 1657–1665.
- Boudard, D., Vasselon, C., Berthéas, M.-F., Jaubert, J., Mounier, C., Reynaud, J., Viallet, A., Chautard, S., Guyotat, D., and Campos, L., 2002. Expression and

LITERATURVERZEICHNIS

- prognostic significance of Bcl-2 family proteins in myelodysplastic syndromes. *American journal of hematology*, 70 (2), 115–25.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringham, F.R., Milner, L.A., Kronenberg, H.M., and Scadden, D.T., 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425 (6960), 841–846.
- Chang, C., Storer, B.E., Scott, B.L., Bryant, E.M., Shulman, H.M., Flowers, M.E., Sandmaier, B.M., Witherspoon, R.P., Nash, R.A., Sanders, J.E., Bedalov, A., Hansen, J.A., Clurman, B.E., Storb, R., Appelbaum, F.R., and Deeg, H.J., 2007. Hematopoietic cell transplantation in patients with myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia arising from myelodysplastic syndrome: Similar outcomes in patients with de novo disease and disease following prior therapy or antecedent hematologic d. *Blood*, 110 (4), 1379–1387.
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C.S., 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell*, 17 (3), 393–403.
- Chen, T.-C., Hou, H.-A., Chou, W.-C., Tang, J.-L., Kuo, Y.-Y., Chen, C.-Y., Tseng, M.-H., Huang, C.-F., Lai, Y.-J., Chiang, Y.-C., Lee, F.-Y., Liu, M.-C., Liu, C.-W., Liu, C.-Y., Yao, M., Huang, S.-Y., Ko, B.-S., Hsu, S.-C., Wu, S.-J., Tsay, W., Chen, Y.-C., and Tien, H.-F., 2014. Dynamics of ASXL1 mutation and other associated genetic alterations during disease progression in patients with primary myelodysplastic syndrome. *Blood Cancer Journal*.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R., 2010. Review The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell*, 37 (3), 299–310.
- Chonghaile, T.N., Sarosiek, K.A., Vo, T.T., Ryan, J.A., Tammareddi, A., Moore, V.D.G., Deng, J., Anderson, K.C., Richardson, P., Tai, Y.T., Mitsiades, C.S., Matulonis, U.A., Drapkin, R., Stone, R., DeAngelo, D.J., McConkey, D.J., Sallan, S.E., Silverman, L., Hirsch, M.S., Carrasco, D.R., and Letai, A., 2011. Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science*, 334 (6059), 1129–1133.
- Choudhary, G.S., Al-Harbi, S., Mazumder, S., Hill, B.T., Smith, M.R., Bodo, J., Hsi, E.D., and Almasan, A., 2015. MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies. *Cell death & disease*, 6 (1), e1593.
- Corey, S.J., Minden, M.D., Barber, D.L., Kantarjian, H., Wang, J.C.Y., and Schimmer, A.D., 2007. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nature reviews. Cancer*, 7 (2), 118–29.
- Cory, S. and Adams, J.M., 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2 (9), 647–656.
- Cory, S., Huang, D.C.S., and Adams, J.M., 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 22 (53), 8590–8607.
- Cragg, M.S., Harris, C., Strasser, A., and Scott, C.L., 2009. Unleashing the power of inhibitors of oncogenic kinases through BH3 mimetics. *Nature Reviews Cancer*, 9 (5), 321–326.
- van Delft, M.F., Wei, A.H., Mason, K.D., Vandenberg, C.J., Chen, L., Czabotar, P.E., Willis, S.N., Scott, C.L., Day, C.L., Cory, S., Adams, J.M., Roberts, A.W., and Huang, D.C.S., 2006. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell*, 10 (5), 389–399.
- Dickens, L.S., Powley, I.R., Hughes, M.A., and MacFarlane, M., 2012. The

LITERATURVERZEICHNIS

- “complexities” of life and death: Death receptor signalling platforms. *Experimental Cell Research*.
- DiNardo, C.D., Rausch, C.R., Benton, C., Kadia, T., Jain, N., Pemmaraju, N., Daver, N., Covert, W., Marx, K.R., Mace, M., Jabbour, E., Cortes, J., Garcia-Manero, G., Ravandi, F., Bhalla, K.N., Kantarjian, H., and Konopleva, M., 2018. Clinical experience with the BCL2-inhibitor venetoclax in combination therapy for relapsed and refractory acute myeloid leukemia and related myeloid malignancies. *American Journal of Hematology*, 93 (3), 401–407.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*.
- Ershler, W.B., Ross, J., Finlay, J.L., and Shahidi, N.T., 1980. Bone-Marrow Microenvironment Defect in Congenital Hypoplastic Anemia. *New England Journal of Medicine*, 302 (24), 1321–1327.
- Fenaux, P., Mufti, G.J., Hellstrom-Lindberg, E., Santini, V., Finelli, C., Giagounidis, A., Schoch, R., Gattermann, N., Sanz, G., List, A., Gore, S.D., Seymour, J.F., Bennett, J.M., Byrd, J., Backstrom, J., Zimmerman, L., McKenzie, D., Beach, C.L., and Silverman, L.R., 2009. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet Oncology*, 10 (3), 223–232.
- Fenaux, P., Muus, P., Kantarjian, H., Lyons, R.M., Larson, R.A., Sekeres, M.A., Becker, P.S., Orejudos, A., and Franklin, J., 2017. Romiplostim monotherapy in thrombocytopenic patients with myelodysplastic syndromes: long-term safety and efficacy. *British Journal of Haematology*, 178 (6), 906–913.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Kepp, O., and Kroemer, G., 2016. Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Alnemri, E.S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E.H., Bazan, N.G., Bertrand, M.J., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D.E., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Cecconi, F., Chan, F.K., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.M., Di Daniele, N., Dixit, V.M., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Fimia, G.M., Flavell, R.A., Fulda, S., Garrido, C., Gougeon, M.L., Green, D.R., Gronemeyer, H., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Hengartner, M.O., Ichijo, H., Joseph, B., Jost, P.J., Kaufmann, T., Kepp, O., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lemasters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., López-Otín, C., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J.C., Martin, S.J., Martinou, J.C., Medema, J.P., Meier, P., Melino, S., Mizushima, N., Moll, U., Muñoz-Pinedo, C., Nuñez, G., Oberst, A., Panaretakis, T., Penninger, J.M., Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Ravichandran, K.S., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Shi, Y., Simon, H.U., Stockwell, B.R., Szabadkai, G., Tait, S.W., Tang, H.L., Tavernarakis, N., Tsujimoto, Y., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Villunger, A., Wagner, E.F., Walczak, H., White, E., Wood, W.G., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Melino, G., and Kroemer, G., 2015. Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*.
- Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G., 2007. Cell death modalities: Classification and pathophysiological

LITERATURVERZEICHNIS

- implications. *Cell Death and Differentiation*.
- Galluzzi, L. and Vitale, I., 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*.
- Gangat, N., Patnaik, M.M., and Tefferi, A., 2016. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *American Journal of Hematology*, 91 (1), 76–89.
- Gattermann, N., Hofmann, W.K., Meeßen, A., Schmitz, S., Tsamaloukas, A., Vollmer, T., Wedding, U., Plesnila-Frank, C., Schramm, W., and Berger, K., 2008. Myelodysplastic syndromes: Aspects of current medical care and economic considerations in Germany. *Onkologie*, 31 (8–9), 477–484.
- Gattermann, N., Kundgen, A., Kellermann, L., Zeffel, M., Paessens, B., and Germing, U., 2013. The impact of age on the diagnosis and therapy of myelodysplastic syndromes: results from a retrospective multicenter analysis in Germany. *Eur J Haematol*.
- Gelsi-Boyer, V., Brecqueville, M., Devillier, R., Murati, A., Mozziconacci, M.J., and Birnbaum, D., 2012. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *Journal of Hematology and Oncology*.
- Geyh, S., Öz, S., Cadeddu, R.P., Fröbel, J., Brückner, B., Kündgen, A., Fenk, R., Bruns, I., Zilkens, C., Hermsen, D., Gattermann, N., Kobbe, G., Germing, U., Lyko, F., Haas, R., and Schroeder, T., 2013. Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. *Leukemia*, 27 (9), 1841–1851.
- Ghobrial, I.M., Detappe, A., Anderson, K.C., and Steensma, D.P., 2018. The bone-marrow niche in MDS and MGUS: Implications for AML and MM. *Nature Reviews Clinical Oncology*.
- Greenberg, B.P., Cox, C., Lebeau, M.M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., Ohyashiki, K., Toyama, K., Aul, C., Mufti, G., and Bennett, J., 1997. International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood*, 89 (6), 2079–88.
- Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M.M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., Ohyashiki, K., Toyama, K., Aul, C., Mufti, G., and Bennett, J., 1997. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 89 (6), 2079–88.
- Greenberg, P.L., 1998. Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: Implications for disease natural history and treatment. *Leukemia Research*, 22 (12), 1123–1136.
- Greenberg, P.L., Attar, E., Bennett, J.M., Bloomfield, C.D., De Castro, C., Deeg, H.J., Foran, J.M., Gaensler, K., Garcia-Manero, G., Gore, S.D., Head, D., Komrokji, R., Maness, L.J., Millenson, M., Nimer, S.D., O'Donnell, M.R., Schroeder, M. a, Shami, P.J., Stone, R.M., Thompson, J.E., and Westervelt, P., 2011. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: myelodysplastic syndromes. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 9, 30–56.
- Greenberg, P.L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-manero, G., Solé, F., Bennett, J.M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Levis, A., Malcovati, L., Cazzola, M., Cermak, J., Beau, M.M. Le, Slovak, M.L., Krieger, O., Luebbert, M., Magalhaes, S.M.M., Miyazaki, Y., Pfeilstöcker, M., Sekeres, M., Sperr, W.R., Stauder, R., Tauro, S., Valent, P., Vallespi, T., De, A.A. Van, Germing, U., Haase, D., and Sole, F., 2012. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes Revised

LITERATURVERZEICHNIS

- International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood*, 120 (12), 2454–2465.
- Greenberg, P.L., Young, N.S., and Gattermann, N., 2002. Myelodysplastic syndromes. *Hematology*, 136–161.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*.
- Heino, T. and Hentunen, T., 2008. Differentiation of Osteoblasts and Osteocytes from Mesenchymal Stem Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 3 (2), 131–145.
- Isern, J. and Mendez-Ferrer, S., 2011. Stem cell interactions in a bone marrow niche. *Curr Osteoporos Rep*, 9 (4), 210–218.
- Jabbour, E.J., Garcia-Manero, G., Strati, P., Mishra, A., Al Ali, N.H., Padron, E., Lancet, J., Kadia, T., Daver, N., O'Brien, S., Steensma, D.P., Sekeres, M.A., Gore, S.D., Dezern, A., Roboz, G.J., List, A.F., Kantarjian, H.M., and Komrokji, R.S., 2015. Outcome of patients with low-risk and intermediate-1-risk myelodysplastic syndrome after hypomethylating agent failure a report on behalf of the MDS clinical research consortium. *Cancer*.
- Jaiswal, S. and Ebert, B.L., 2014. Previews MDS Is a Stem Cell Disorder After All GNAQ / 11 Mutations in Uveal Melanoma: Is YAP the Key to Targeted Therapy? *CCELL*, 25 (6), 713–714.
- Jilg, S., Reidel, V., Müller-Thomas, C., König, J., Schauwecker, J., Höckendorf, U., Huberle, C., Gorka, O., Schmidt, B., Burgkart, R., Ruland, J., Kolb, H.-J., Peschel, C., Oostendorp, R.A.J., Götze, K.S., and Jost, P.J., 2015. Blockade of BCL-2 proteins efficiently induces apoptosis in progenitor cells of high-risk myelodysplastic syndromes patients. *Leukemia*, (January 2015), 112–123.
- Kaefer, A., Yang, J., Noertersheuser, P., Mensing, S., Humerickhouse, R., Awni, W., and Xiong, H., 2014. Mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis of navitoclax (ABT-263) induced thrombocytopenia. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 74 (3), 593–602.
- Kantarjian, H.M., Giles, F.J., Greenberg, P.L., Paquette, R.L., Wang, E.S., Gabilove, J.L., Garcia-Manero, G., Hu, K., Franklin, J.L., and Berger, D.P., 2010. Phase 2 study of romiplostim in patients with low- or intermediate-risk myelodysplastic syndrome receiving azacitidine therapy. *Blood*, 116 (17), 3163–3170.
- Ke, F., Grabow, S., Kelly, G., Lin, A., O'Reilly, L., and Strasser, A., 2015. Impact of the combined loss of BOK, BAX and BAK on the hematopoietic system is slightly more severe than compound loss of BAX and BAK. *Cell Death and Disease*, 6 (10).
- Kerbaui, D.B. and Deeg, H.J., 2007. Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome. *Experimental Hematology*, 35 (11), 1739–1746.
- Kerbaui, D.M.B., Lesnikov, V., Torok-Storb, B., Bryant, E., and Deeg, H.J., 2004. Engraftment of distinct clonal MDS-derived hematopoietic precursors in NOD/SCID- β 2-microglobulin-deficient mice after intramedullary transplantation of hematopoietic and stromal cells. *Blood*, 104 (7), 2202 LP-2203.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*.
- Khan, N. and Kahl, B., 2018. Targeting BCL-2 in Hematologic Malignancies. *Targeted Oncology*.
- Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P.P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., Shi, Y.-X., Sneed, T., Verhaegen, M., Soengas, M., Ruvolo, V.R.,

LITERATURVERZEICHNIS

- McQueen, T., Schober, W.D., Watt, J.C., Jiffar, T., Ling, X., Marini, F.C., Harris, D., Dietrich, M., Estrov, Z., McCubrey, J., May, W.S., Reed, J.C., and Andreeff, M., 2006. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer cell*, 10 (5), 375–88.
- Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A.L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G.L., Gong, J.N., Moujalled, D.M., Bruno, A., Csekei, M., Paczal, A., Szabo, Z.B., Sipos, S., Radics, G., Proszenyak, A., Balint, B., Ondi, L., Blasko, G., Robertson, A., Surgenor, A., Dokurno, P., Chen, I., Matassova, N., Smith, J., Pedder, C., Graham, C., Studeny, A., Lysiak-Auvity, G., Girard, A.M., Gravič¹/₂, F., Segal, D., Riffkin, C.D., Pomilio, G., Galbraith, L.C.A., Aubrey, B.J., Brennan, M.S., Herold, M.J., Chang, C., Guasconi, G., Cauquil, N., Melchiorre, F., Guigal-Stephan, N., Lockhart, B., Colland, F., Hickman, J.A., Roberts, A.W., Huang, D.C.S., Wei, A.H., Strasser, A., Lessene, G., and Geneste, O., 2016. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature*.
- Krysko, D. V., Garg, A.D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., and Vandenabeele, P., 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*.
- Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W.D., Czabotar, P.E., Fischer, S.F., Perugini, M.A., Huang, D.C.S., and Colman, P.M., 2008. Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death and Differentiation*, 15 (10), 1564–1571.
- Ledran, M.H., Krassowska, A., Armstrong, L., Dimmick, I., Renström, J., Lang, R., Yung, S., Santibanez-Coref, M., Dzierzak, E., Stojkovic, M., Oostendorp, R.A.J., Forrester, L., and Lako, M., 2008. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell*, 3 (1), 85–98.
- Letai, A., 2005. BCL-2: Found bound and drugged! *Trends in Molecular Medicine*.
- Li, A.J. and Calvi, L.M., 2017. The microenvironment in myelodysplastic syndromes: Niche-mediated disease initiation and progression. *Experimental Hematology*.
- List, A., Dewald, G., Bennett, J., Giagounidis, A., Raza, A., Feldman, E., Powell, B., Greenberg, P., Thomas, D., Stone, R., Reeder, C., Wride, K., Patin, J., Schmidt, M., Zeldis, J., and Knight, R., 2006. Lenalidomide in the Myelodysplastic Syndrome with Chromosome 5q Deletion. *New England Journal of Medicine*, 355 (14), 1456–1465.
- Ma, X., Does, M., Raza, A., and Mayne, S.T., 2007. Myelodysplastic syndromes: Incidence and survival in the United States. *Cancer*, 109 (8), 1536–1542.
- Malcovati, L., Porta, M.G. Della, Strupp, C., Ambaglio, I., Kuendgen, A., Nacht kamp, K., Travaglino, E., Invernizzi, R., Pascutto, C., Lazzarino, M., Germing, U., and Cazzola, M., 2011. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based prognostic scoring system (WPSS). *Haematologica*, 96 (10), 1433–1440.
- Matzner, Y. and Polliack, A., 1981. Bone marrow curettage in myelodysplastic disorders: A stimulus for regeneration in disturbed hematopoiesis. *JAMA*, 246 (17), 1926–1928.
- Medeiros, B.C., Satram-Hoang, S., Hurst, D., Hoang, K.Q., Momin, F., and Reyes, C., 2015. Big data analysis of treatment patterns and outcomes among elderly acute myeloid leukemia patients in the United States. *Annals of Hematology*, 94 (7), 1127–1138.
- Mihalyova, J., Jelinek, T., Growkova, K., Hrdinka, M., Simicek, M., and Hajek, R.,

LITERATURVERZEICHNIS

2018. Venetoclax: a new wave in hematooncology. *Experimental Hematology*.
- Montalban-Bravo, G. and Garcia-Manero, G., 2018. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*, 93 (1), 129–147.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M., 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*.
- Neukirchen, J., Fox, F., Kündgen, A., Nachtkamp, K., Strupp, C., Haas, R., Germing, U., and Gattermann, N., 2012. Improved survival in MDS patients receiving iron chelation therapy - A matched pair analysis of 188 patients from the Düsseldorf MDS registry. *Leukemia Research*, 36 (8), 1067–1070.
- Neukirchen, J., Nachtkamp, K., Schemenau, J., Aul, C., Giagounidis, A., Strupp, C., Kuendgen, A., Kobbe, G., Haas, R., and Germing, U., 2015. Change of prognosis of patients with myelodysplastic syndromes during the last 30 years. *Leukemia Research*, 39 (7), 679–683.
- Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B. a, Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., Joseph, M.K., Kitada, S., Korsmeyer, S.J., Kunzer, A.R., Letai, A., Li, C., Mitten, M.J., Nettesheim, D.G., Ng, S., Nimmer, P.M., O'Connor, J.M., Oleksijew, A., Petros, A.M., Reed, J.C., Shen, W., Tahir, S.K., Thompson, C.B., Tomaselli, K.J., Wang, B., Wendt, M.D., Zhang, H., Fesik, S.W., and Rosenberg, S.H., 2005. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, 435 (7042), 677–81.
- Oostendorp, R. a J., Medvinsky, A.J., Kusadasi, N., Nakayama, N., Harvey, K., Orelia, C., Ottersbach, K., Covey, T., Ploemacher, R.E., Saris, C., and Dzierzak, E., 2002. Embryonal subregion-derived stromal cell lines from novel temperature-sensitive SV40 T antigen transgenic mice support hematopoiesis. *Journal of cell science*, 115 (Pt 10), 2099–2108.
- Pang, W.W., Pluinage, J. V, Price, E.A., Sridhar, K., Arber, D.A., and Greenberg, P.L., 2013. Hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodysplastic syndromes, 110 (8).
- Parker, J.E., Fishlock, K.L., Mijovic, A., Czepulkowski, B., Pagliuca, A., and Mufti, G.J., 1998. “Low-risk” myelodysplastic syndrome is associated with excessive apoptosis and an increased ratio of pro- versus anti-apoptotic bcl-2-related proteins. *British Journal of Haematology*, 103 (4), 1075–1082.
- Parker, J.E., Mufti, G.J., Rasool, F., Mijovic, A., Devereux, S., and Pagliuca, A., 2000. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood*, 96 (12), 3932–8.
- Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S., and Salvesen, G.S., 2006. The Apoptosome Activates Caspase-9 by Dimerization. *Molecular Cell*, 22 (2), 269–275.
- Punnoose, E.A., Levenson, J.D., Peale, F., Boghaert, E.R., Belmont, L.D., Tan, N., Young, A., Mitten, M., Ingalla, E., Darbonne, W.C., Oleksijew, A., Tapang, P., Yue, P., Oeh, J., Lee, L., Maiga, S., Fairbrother, W.J., Amiot, M., Souers, A.J., and Sampath, D., 2016. Expression Profile of BCL-2, BCL-XL, and MCL-1 Predicts Pharmacological Response to the BCL-2 Selective Antagonist Venetoclax in Multiple Myeloma Models. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15 (5), 1132–1144.
- Raaijmakers, M.H.G.P., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T.,

LITERATURVERZEICHNIS

- Schoonmaker, J.A., Ebert, B.L., Al-Shahrour, F., Hasserjian, R.P., Scadden, E.O., Aung, Z., Matza, M., Merckenschlager, M., Lin, C., Rommens, J.M., and Scadden, D.T., 2010. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*, 464 (7290), 852–7.
- Raaijmakers, M.H.G.P. and Scadden, D.T., 2008. Evolving concepts on the microenvironmental niche for hematopoietic stem cells. *Current opinion in hematology*, 15 (4), 301–306.
- Raza, A. and Galili, N., 2012. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nature Reviews Cancer*.
- Reidel, V., Kauschinger, J., Hauch, R.T., Müller-Thomas, C., Nadarajah, N., Burgkart, R., Schmidt, B., Hempel, D., Jacob, A., Slotta-Huspenina, J., Höckendorf, U., Peschel, C., Kern, W., Haferlach, T., Götze, K.S., Jilg, S., and Jost, P.J., 2018. Selective inhibition of BCL-2 is a promising target in patients with high-risk myelodysplastic syndromes and adverse mutational profile. *Oncotarget*, 9 (25), 17270–17281.
- Rosenfeld, C. and List, A., 2000. A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies. *Leukemia*, 14 (1), 2–8.
- Rudin, C.M., Hann, C.L., Garon, E.B., Ribeiro De Oliveira, M., Bonomi, P.D., Camidge, D.R., Chu, Q., Giaccone, G., Khaira, D., Ramalingam, S.S., Ranson, M.R., Dive, C., McKeegan, E.M., Chyla, B.J., Dowell, B.L., Chakravartty, A., Nolan, C.E., Rudersdorf, N., Busman, T.A., Mabry, M.H., Krivoschik, A.P., Humerickhouse, R.A., Shapiro, G.I., and Gandhi, L., 2012. Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 18 (11), 3163–3169.
- Sandigursky, S., Silverman, G.J., and Mor, A., 2017. Targeting the programmed cell death-1 pathway in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*.
- Santini, V., 2011. Clinical Use of Erythropoietic Stimulating Agents in Myelodysplastic Syndromes. *The Oncologist*, 16 (Supplement 3), 35–42.
- Santini, V., Almeida, A., Giagounidis, A., Gröpper, S., Jonasova, A., Vey, N., Mufti, G.J., Buckstein, R., Mittelman, M., Platzbecker, U., Shpilberg, O., Ram, R., Cañizo, C. Del, Gattermann, N., Ozawa, K., Risueño, A., MacBeth, K.J., Zhong, J., Séguy, F., Hoenekopp, A., Beach, C.L., and Fenaux, P., 2016. Randomized phase III study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with lower-risk non-del(5q) myelodysplastic syndromes and ineligible for or refractory to erythropoiesis-stimulating agents. *In: Journal of Clinical Oncology*. 2988–2996.
- Scadden, D.T., 2006. The stem-cell niche as an entity of action, 441 (June), 1075–1079.
- Schanz, J., Tüchler, H., Solé, F., Mallo, M., Luño, E., Cervera, J., Granada, I., Hildebrandt, B., Slovak, M.L., Ohyashiki, K., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Valent, P., Giagounidis, A., Aul, C., Lübbert, M., Stauder, R., Krieger, O., Garcia-Manero, G., Faderl, S., Pierce, S., Le Beau, M.M., Bennett, J.M., Greenberg, P., Germing, U., and Haase, D., 2012. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *Journal of Clinical Oncology*, 30 (8), 820–829.
- Schroeder, T., Geyh, S., Germing, U., and Haas, R., 2016. Mesenchymal stromal cells in myeloid malignancies. *Blood Research*.
- Silverman, L.R., Demakos, E.P., Peterson, B.L., Kornblith, A.B., Holland, J.F.J.C.,

LITERATURVERZEICHNIS

- Odchimar-Reissig, R., Stone, R.M., Nelson, D., Powell, B.L., DeCastro, C.M., Ellerton, J., Larson, R.A., Schiffer, C.A., and Holland, J.F.J.C., 2002. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20 (10), 2429–2440.
- Slape, C.I., Saw, J., Jowett, J.B.M., Aplan, P.D., Strasser, A., Jane, S.M., and Curtis, D.J., 2012. Inhibition of apoptosis by BCL2 prevents leukemic transformation of a murine myelodysplastic syndrome. *Blood*, 120 (12), 2475–83.
- Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., Huang, D.C.S., Hymowitz, S.G., Jin, S., Khaw, S.L., Kovar, P.J., Lam, L.T., Lee, J., Maecker, H.L., Marsh, K.C., Mason, K.D., Mitten, M.J., Nimmer, P.M., Oleksijew, A., Park, C.H., Park, C., Phillips, D.C., Roberts, A.W., Sampath, D., Seymour, J.F., Smith, M.L., Sullivan, G.M., Tahir, S.K., Tse, C., Wendt, M.D., Xiao, Y., Xue, J.C., Zhang, H., Humerickhouse, R.A., Rosenberg, S.H., and Elmore, S.W., 2013. ABT-199 , a potent and selective BCL-2 inhibitor , achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*, 19 (2), 202–208.
- Stilgenbauer, S., Eichhorst, B., Schetelig, J., Coutre, S., Seymour, J.F., Munir, T., Puvvada, S.D., Wendtner, C.M., Roberts, A.W., Jurczak, W., Mulligan, S.P., Böttcher, S., Mobasher, M., Zhu, M., Desai, M., Chyla, B., Verdugo, M., Enschede, S.H., Cerri, E., Humerickhouse, R., Gordon, G., Hallek, M., and Wierda, W.G., 2016. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 17 (6), 768–778.
- Strasser, A., Cory, S., and Adams, J.M., 2011. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *The EMBO journal*, 30 (18), 3667–83.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T., 2006. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity*, 25 (6), 977–988.
- Tamplin, O.J., Durand, E.M., Carr, L.A., Childs, S.J., Hagedorn, E.J., Li, P., Yzaguirre, A.D., Speck, N.A., and Zon, L.I., 2015. Hematopoietic stem cell arrival triggers dynamic remodeling of the perivascular niche. *Cell*.
- Tang, X., Zhang, L., Tang, Y., and Wang, D., 2017. Treatment of low-risk myelodysplastic syndromes. *Journal of Leukemia and Lymphoma*, 26 (1), 8–11.
- Tefferi, A. and Vardiman, J.W., 2013. Myelodysplastic Syndromes.
- Thornberry, N. and Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281, 1312–1316.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., and Croce, C.M., 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226 (4678), 1097–1099.
- Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V., 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*.
- Vardiman, J.W., 2010. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chemico-Biological Interactions*, 184 (1–2), 16–20.
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., and Bloomfield, C.D., 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important

LITERATURVERZEICHNIS

- changes. *Blood*.
- Varnum-Finney, B., Brashem-Stein, C., and Bernstein, I.D., 2003. Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. *Blood*, 101 (5), 1784–1789.
- Venderova, K. and Park, D.S., 2012. Programmed Cell Death in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2 (8), a009365–a009365.
- Vo, T., Ryan, J., Carrasco, R., Neuberg, D., Rossi, D.J., Stone, R., Deangelo, D.J., Frattini, M.G., and Letai, A., 2013. Relative Mitochondrial Priming of Malignant Myeloblasts and Normal HSCs Determines Chemotherapeutic Success in AML, 151 (2), 617–632.
- Walter, M.J., Shen, D., Ding, L., Shao, J., Koboldt, D.C., Chen, K., Larson, D.E., McLellan, M.D., Dooling, D., Abbott, R., Fulton, R., Magrini, V., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., O’Laughlin, M., Fan, X., Grillo, M., Witowski, S., Heath, S., Frater, J.L., Eades, W., Tomasson, M., Westervelt, P., DiPersio, J.F., Link, D.C., Mardis, E.R., Ley, T.J., Wilson, R.K., and Graubert, T.A., 2012. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 366 (12), 1090–1098.
- Warlick, E.D., Cioc, A., DeFor, T., Dolan, M., and Weisdorf, D., 2009. Allogeneic Stem Cell Transplantation for Adults with Myelodysplastic Syndromes: Importance of Pretransplant Disease Burden. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 15 (1), 30–38.
- West, A.P. and Shadel, G.S., 2017. Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. *Nature Reviews Immunology*.
- Wetzko, K. and Platzbecker, U., 2014. Transplants in myelodysplastic syndromes. *Hematology/Oncology Clinics of North America*.
- Wierda, W.G., Zelenetz, A.D., Gordon, L.I., Abramson, J.S., Advani, R.H., Andreadis, C.B., Bartlett, N., Byrd, J.C., Caimi, P., Fayad, L.E., Fisher, R.I., Glenn, M.J., Habermann, T.M., Harris, N.L., Hernandez-Ilizaliturri, F., Hoppe, R.T., Horwitz, S.M., Kaminski, M.S., Kelsey, C.R., Kim, Y.H., Krivacic, S., LaCasce, A.S., Martin, M.G., Nademanee, A., Porcu, P., Press, O., Rabinovitch, R., Reddy, N., Reid, E., Roberts, K., Saad, A.A., Snyder, E.D., Sokol, L., Swinnen, L.J., Vose, J.M., Yahalom, J., Dwyer, M.A., and Sundar, H., 2017. NCCN Guidelines Insights: Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Leukemia, Version 1.2017. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 15 (3), 293–311.
- Wilson, A. and Trumpp, A., 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology*, 6 (2), 93–106.
- Woll, P.S., Kjällquist, U., Chowdhury, O., Doolittle, H., Wedge, D.C., Thongjuea, S., Erlandsson, R., Ngara, M., Anderson, K., Deng, Q., Mead, A.J., Stenson, L., Giustacchini, A., Duarte, S., Giannoulatou, E., Taylor, S., Karimi, M., Scharenberg, C., Mortera-Blanco, T., Macaulay, I.C., Clark, S.A., Dybedal, I., Josefsen, D., Fenaux, P., Hokland, P., Holm, M.S., Cazzola, M., Malcovati, L., Tauro, S., Bowen, D., Boulwood, J., Pellagatti, A., Pimanda, J.E., Unnikrishnan, A., Vyas, P., Göhring, G., Schlegelberger, B., Tobiasson, M., Kvalheim, G., Constantinescu, S.N., Nerlov, C., Nilsson, L., Campbell, P.J., Sandberg, R., Papaemmanuil, E., Hellström-Lindberg, E., Linnarsson, S., and Jacobsen, S.E.W., 2014. Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo. *Cancer Cell*, 25 (6), 794–808.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., and Currie, A.R., 1980. Cell Death: The Significance of Apoptosis. *International Review of Cytology*, 68, 251–306.

LITERATURVERZEICHNIS

- Youle, R.J. and Strasser, A., 2008. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Zhai, D., Jin, C., Satterthwait, A.C., and Reed, J.C., 2006. Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cell Death and Differentiation*.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., Harris, S., Wiedemann, L.M., Mishina, Y., and Li, L., 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425 (October), 836–841.
- Zhou, L., Zhang, Y., Sampath, D., Levenson, J., Dai, Y., Kmiecik, M., Nguyen, M., Orłowski, R.Z., and Grant, S., 2018. Flavopiridol enhances ABT-199 sensitivity in unfavourable-risk multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *British Journal of Cancer*, 118 (3), 388–397.
- Zhu, H. and Almasan, A., 2017. Development of venetoclax for therapy of lymphoid malignancies. *Drug Design, Development and Therapy*.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X., 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90 (3), 405–413.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Formen des regulierten Zelltods.....	12
Abbildung 2: Hallmarks of Cancer – the next Generation.....	13
Abbildung 3: Apoptose-Signalwege.....	15
Abbildung 4: Bindungsprofile der BH3-only Proteine.....	16
Abbildung 5: Koloniearten in der Langzeitkultur.....	25
Abbildung 6: Keine relevante Apoptoseinduktion durch ABT-737 in gesunden Vorläuferzellen des Knochenmarks.....	30
Abbildung 7: Effektive Apoptoseinduktion durch ABT-737 in Vorläuferzellen von Hochrisiko- oder sAML-Proben.....	31
Abbildung 8: ABT-737 induziert Risikogruppen-abhängig Apoptose in CD34⁺-Vorläuferzellen des Knochenmarks.....	33
Abbildung 9: ABT-737 induziert Risikogruppen-abhängig Apoptose auch in differenzierteren MDS-Knochenmarkzellen.....	34
Abbildung 10: ABT-737 reduziert effektiv die Koloniebildung der Vorläuferzellen von Hochrisiko-MDS-Patientenproben, nicht aber der gesunden oder Knochenmarkzellen niedrigeren Risikoprofils.....	36
Abbildung 11: Stromazellen vermindern den Effekt der Apoptoseinduktion durch ABT-737 auf Knochenmarkzellen des Hochrisiko-MDS nur leicht.....	38

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Klinische und genetische Merkmale der MDS-/sAML-Patienten	28
Tabelle 2: Durchschnittsalter der eingeschlossenen Patienten	29

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Rahmen des im Folgenden genannten Artikels veröffentlicht:

Jilg S, Reidel V, Müller-Thomas C, **König J**, Schauwecker J, Höckendorf U, Huberle C, Gorka O, Schmidt B, Burgkart R, Ruland J, Kolb HJ, Peschel C, Oostendorp RA, Götze KS, Jost PJ.

Blockade of BCL-2 proteins efficiently induces apoptosis in progenitor cells of high-risk myelodysplastic syndromes patients.

Leukemia. 2016, 30, 112-123

Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Christian Peschel und seinem Nachfolger Prof. Dr. Florian Bassermann, die mir ermöglichten, die Dissertation an ihrer Klinik durchzuführen.

Vor allem möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Philipp Jost für die Überlassung des spannenden Themas und fortwährende Unterstützung danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Stefanie Jilg, die durch ihre unermüdliche und direkte Art eine unverzichtbare Hilfe darstellte.

Ich danke Lotti Oberländer für ihre motivierende Art sowie Herbert Leyh und Ulrike Necknig für die Unterstützung während der Verfassung der Arbeit neben meiner klinischen Tätigkeit.

Danke an Gabriele und Dr. Georg Heilgemeir, Ihr seid unheimlich wichtige Menschen für mich und Vorbilder wie Ratgeber.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern Barbara und Uwe König und meinem Bruder Lukas, die mir zu jeder Zeit Ratgeber, Freunde und Zuhörer waren. Ihr habt es überhaupt ermöglicht, dass ich das Studium und diese Arbeit machen konnte – ich bin Euch unendlich dankbar.