

Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung: Innere Medizin II

(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, klinische Immunologie und  
Rheumatologie)

**Systematische Evaluierung des antileukämischen Potentials  
dreier neuer small-molecule BCL-2-pathway-Inhibitoren in  
akuter myeloischer Leukämie**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Fröhlich, Rebecca Katharina  
2023**

**Dekan:** Professor Dr. B. Pichler  
**1. Berichterstatter:** Privatdozent Dr. M. Schittenhelm  
**2. Berichterstatter:** Professorin Dr. K. Schilbach-Stückle  
  
**Tag der Disputation:** 10.01.2023

# Inhaltsverzeichnis

I.	Abbildungsverzeichnis .....	1
II.	Tabellenverzeichnis.....	5
III.	Abkürzungsverzeichnis .....	6
IV.	Abstract .....	7

## 1. Einleitung

1.1.	Akute myeloische Leukämie .....	8
1.2.	Die BCL-2-Proteinfamilie .....	14
1.3.	BCL-2-Inhibitoren .....	15
1.4.	MCL-1-Inhibitoren .....	16
1.5.	CDK-9-Inhibitoren .....	17
1.6.	Decitabin.....	18
1.7.	Akute lymphatische Leukämie .....	18
1.8.	Fragestellung der Arbeit .....	20

## 2. Material und Methoden

2.1.	Material .....	21
2.1.1.	Verbrauchs-/Einwegmaterialien .....	21
2.1.2.	Zellkulturmedien und -zubehör .....	21
2.1.3.	Laborgeräte .....	22
2.1.4.	Software .....	22
2.1.5.	Reagenzien.....	23
2.1.6.	Inhibitoren .....	23
2.1.7.	Heparin-Blut und -Knochenmark von Patienten .....	23
2.1.8.	Zelllinien .....	24
2.2.	Methoden.....	25
2.2.1.	Zellkultur.....	25
2.2.2.	Proliferations-/ Viabilitäts-Assays.....	26
2.2.3.	Apoptose-Assays.....	26
2.2.4.	Isolierung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	28
2.2.5.	Statistische Methoden .....	28

### 3. Ergebnisse

<b>3.1. Antiproliferative Wirkung der BCL-2-Inhibitoren auf AML-Zelllinien .....</b>	<b>31</b>
3.1.1. Antiproliferative Wirkung von AZD 4320 (dualer BCL-2/XL-Inhibitor) auf AML-Zelllinien.....	31
3.1.2. Antiproliferative Wirkung von AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) auf AML-Zelllinien .....	33
3.1.3. Antiproliferative Wirkung von AZD 4573 (CDK-9-Inhibitor) auf AML-Zelllinien .....	36
<b>3.2. Apoptose-Induktion an AML-Zelllinien durch BCL-2-Inhibitoren .....</b>	<b>38</b>
3.2.1. Dosisabhängige Apoptose-Induktion durch AZD 4320 (dualer BCL-2/XL-Inhibitor) an AML-Zelllinien .....	38
3.2.2. Dosisabhängige Apoptose-Induktion durch AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) an AML-Zelllinien.....	43
3.2.3. Dosisabhängige Apoptose-Induktion durch AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) an AML-Zelllinien .....	47
<b>3.3. Apoptose-Induktion an AML-Zelllinien durch Kombination von BCL-2-Inhibitoren mit Decitabin (DAC) .....</b>	<b>51</b>
3.3.1. Ermittlung geeigneter DAC-Konzentrationen für die Kombinationsbehandlung .....	51
3.3.2. Apoptose-Induktion an AML-Zelllinien durch Kombination von AZD 4320 (BCL-2/XL-Inhibitor) mit Decitabin (DAC) .....	52
3.3.3. Apoptose-Induktion an AML-Zelllinien durch Kombination von AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) mit Decitabin (DAC) .....	56
3.3.4. Apoptose-Induktion durch Kombination von AZD 4573 (CDK-9-Inhibitor) mit Decitabin (DAC) an AML-Zelllinien.....	60
<b>3.4. Inhibitoren reduzieren dosisabhängig die Anzahl von AML-Blasten ex-vivo.....</b>	<b>65</b>
3.4.1. AZD 4320 (dualer BCL-2/XL-Inhibitor) reduziert dosisabhängig die Anzahl von AML-Blasten ex-vivo .....	65
3.4.2. AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) reduziert dosisabhängig die Anzahl von AML-Blasten ex-vivo.....	66
3.4.3. AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) reduziert dosisabhängig die Anzahl von AML-Blasten ex-vivo .....	67

<b>3.5. Antiproliferative Wirkung und Apoptose-Induktion der BCL-2-Inhibitoren im ALL-Modell</b> .....	70
3.5.1. Antiproliferative Wirkung der BCL-2-Inhibitoren auf die ALL-Zelllinie Jurkat .....	70
3.5.2. Apoptose-Induktion durch die BCL-2-Inhibitoren in der ALL-Zelllinie Jurkat .....	72
3.5.3. Inhibitoren reduzieren dosisabhängig die Anzahl von ALL-Blasten ex-vivo .....	76
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>80</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>86</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>87</b>
<b>7. Erklärung zum Eigenanteil</b> .....	<b>92</b>
<b>8. Veröffentlichungen</b> .....	<b>93</b>
<b>9. Danksagung</b> .....	<b>94</b>
<b>10. Lebenslauf</b> .....	<b>95</b>

## I. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** AML-Inzidenz-Fallzahlen 2016 in Deutschland
- Abb. 2** AML-Blasten vor Erythrozyten in Pappenheim-gefärbten Differential-Blutausstrich
- Abb. 3** Mutationen in de-novo-AML
- Abb. 4** Über Proteine der Bcl-2-Familie-vermittelte intrinsische Weg der Apoptose, und Einfluss des Primings mit BIM auf den Therapie-Erfolg von Bcl-2-Inhibitoren
- Abb. 5** ALL-Blasten vor Erythrozyten in Pappenheim-gefärbten Differential-Blutausstrich
- Abb. 6** Dotplot-Diagramme am FACS Calibur
- Abb. 7** Dosisabhängige Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4320 (dualer BCL-2/XL-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie MOLM-13
- Abb. 8** Dosisabhängige Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4320 (dualer BCL-2/XL-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie MOLM-14
- Abb. 9** Dosisabhängige Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4320 (dualer BCL-2/XL-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie OCI AML3
- Abb. 10** Dosisabhängige Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4320 (dualer BCL-2/XL-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie HL-60
- Abb. 11** Dosisabhängige Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie MOLM-13
- Abb. 12** Dosisabhängige Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie MOLM-14
- Abb. 13** Dosisabhängige Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie OCI AML3
- Abb. 14** Dosisabhängige Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie HL-60
- Abb. 15** Dosisabhängige Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie MOLM-13
- Abb. 16** Dosisabhängige Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie MOLM-14
- Abb. 17** Dosisabhängige Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie OCI AML3
- Abb. 18** Dosisabhängige Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie HL-60
- Abb. 19** A: Dosisabhängige Apoptose-Induktion bei der AML-Zelllinie MOLM-13 nach 48 Stunden Behandlung mit dualem BCL-2-/XL-Inhibitor (AZD 4320)  
B: Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten  $IC_{50}$   
C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch)
- Abb. 20** A: Dosisabhängige Apoptose-Induktion bei der AML-Zelllinie MOLM-14 nach 48 Stunden Behandlung mit dualem BCL-2-/XL-Inhibitor (AZD 4320)  
B: Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten  $IC_{50}$   
C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch)

- Abb. 21** A: Dosisabhängige Apoptose-Induktion bei der AML-Zelllinie OCI AML3 nach 48 Stunden Behandlung mit dualem BCL-2-/XL-Inhibitor (AZD 4320)  
B: Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten  $IC_{50}$   
C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch)
- Abb. 22** A: Dosisabhängige Apoptose-Induktion bei der AML-Zelllinie HL-60 nach 48 Stunden Behandlung mit dualem BCL-2-/XL-Inhibitor (AZD 4320)  
B: Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten  $IC_{50}$   
C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch)
- Abb. 23** A: Dosisabhängige Apoptose-Induktion bei der AML-Zelllinie MOLM-13 nach 48 Stunden Behandlung mit MCL-1-Inhibitor (AZD 5991)  
B: Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten  $IC_{50}$   
C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch)
- Abb. 24** A: Dosisabhängige Apoptose-Induktion bei der AML-Zelllinie MOLM-14 nach 48 Stunden Behandlung mit MCL-1-Inhibitor (AZD 5991)  
B: Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten  $IC_{50}$   
C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch)
- Abb. 25** A: Dosisabhängige Apoptose-Induktion bei der AML-Zelllinie OCI AML3 nach 48 Stunden Behandlung mit MCL-1-Inhibitor (AZD 5991)  
B: Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten  $IC_{50}$   
C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch)
- Abb. 26** A: Dosisabhängige Apoptose-Induktion bei der AML-Zelllinie HL-60 nach 48 Stunden Behandlung mit MCL-1-Inhibitor (AZD 5991)  
B: Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten  $IC_{50}$   
C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch)
- Abb. 27** A: Dosisabhängige Apoptose-Induktion bei der AML-Zelllinie MOLM-13 nach 48 Stunden Behandlung mit selektivem CDK-9-Inhibitor (AZD 4573)  
B: Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten  $IC_{50}$   
C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch)
- Abb. 28** A: Dosisabhängige Apoptose-Induktion bei der AML-Zelllinie MOLM-14 nach 48 Stunden Behandlung mit selektivem CDK-9-Inhibitor (AZD 4573)  
B: Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten  $IC_{50}$   
C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch)
- Abb. 29** A: Dosisabhängige Apoptose-Induktion bei der AML-Zelllinie OCI AML3 nach 48 Stunden Behandlung mit selektivem CDK-9-Inhibitor (AZD 4573)  
B: Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten  $IC_{50}$   
C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch)
- Abb. 30** A: Dosisabhängige Apoptose-Induktion bei der AML-Zelllinie HL-60 nach 48 Stunden Behandlung mit selektivem CDK-9-Inhibitor (AZD 4573)  
B: Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten  $IC_{50}$   
C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch)
- Abb. 31** Dosisabhängige Apoptose-Induktion bei den Leukämie-Zelllinien MOLM-13, MOLM-14, OCI AML3 und HL-60 nach 48 Stunden Behandlung mit DAC
- Abb. 32** Vergleich der Apoptoserate der AML-Zelllinie MOLM-13 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4320 -DAC (hellgrau) und AZD 4320 + 100nM DAC (dunkelgrau)

- Abb. 33** Isologramm der Kombinationsbehandlung AZD 4320 + DAC an MOLM-13-Zellen
- Abb. 34** Vergleich der Apoptoserate der AML-Zelllinie MOLM-14 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4320 -DAC (hellgrau) und AZD 4320 + 100nM DAC (dunkelgrau)
- Abb. 35** Isologramm der Kombinationsbehandlung AZD 4320 + DAC an MOLM-14-Zellen
- Abb. 36** Vergleich der Apoptoserate der AML-Zelllinie OCI AML3 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4320 -DAC (hellgrau) und AZD 4320 + 1000nM DAC (dunkelgrau)
- Abb. 37** Vergleich der Apoptoserate der AML-Zelllinie HL-60 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4320 -DAC (hellgrau) und AZD 4320 + 1000nM DAC (dunkelgrau)
- Abb. 38** Vergleich der Apoptoserate der AML-Zelllinie MOLM-13 nach 48 Stunden Behandlung AZD 5991 -DAC (hellgrau) und AZD 5991 + 100nM DAC (dunkelgrau)
- Abb. 39** Isologramm der Kombinationsbehandlung AZD 5991 + DAC an MOLM-13-Zellen
- Abb. 40** Vergleich der Apoptoserate der AML-Zelllinie MOLM-14 nach 48 Stunden Behandlung AZD 5991 -DAC (hellgrau) und AZD 5991 + 100nM DAC (dunkelgrau)
- Abb. 41** Isologramm der Kombinationsbehandlung AZD 5991 + DAC an MOLM-14-Zellen
- Abb. 42** Vergleich der Apoptoserate der AML-Zelllinie OCI AML3 nach 48 Stunden Behandlung AZD 5991 -DAC (hellgrau) und AZD 5991 + 1000nM DAC (dunkelgrau)
- Abb. 43** Isologramm der Kombinationsbehandlung AZD 5991 + DAC an OCI AML3-Zellen
- Abb. 44** Vergleich der Apoptoserate der AML-Zelllinie HL-60 nach 48 Stunden Behandlung AZD 5991 -DAC (hellgrau) und AZD 5991 + 1000nM DAC (dunkelgrau)
- Abb. 45** Vergleich der Apoptoserate der AML-Zelllinie MOLM-13 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4573 -DAC (hellgrau) und AZD 4573 + 100nM DAC (dunkelgrau)
- Abb. 46** Isologramm der Kombinationsbehandlung AZD 4573 + DAC an MOLM-13-Zellen
- Abb. 47** Vergleich der Apoptoserate der AML-Zelllinie MOLM-14 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4573 -DAC (hellgrau) und AZD 4573 + 100nM DAC (dunkelgrau)
- Abb. 48** Isologramm der Kombinationsbehandlung AZD 4573 + DAC an MOLM-14-Zellen
- Abb. 49** Vergleich der Apoptoserate der AML-Zelllinie OCI AML3 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4573 -DAC (hellgrau) und AZD 4573 + 1000nM DAC (dunkelgrau)
- Abb. 50** Isologramm der Kombinationsbehandlung AZD 4573 + DAC an OCI AML3-Zellen
- Abb. 51** Vergleich der Apoptoserate der AML-Zelllinie HL-60 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4573 -DAC (hellgrau) und AZD 4573 + 1000nM DAC (dunkelgrau)
- Abb. 52** Isobologramm Kombinationsbehandlung AZD 4573 + DAC an HL-60-Zellen
- Abb. 53** Apoptose-Induktion an PBMCs isoliert aus EDTA-Blut von neu-diagnostizierten AML-Patienten nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 4320
- Abb. 54** Relative Apoptoseraten der AML-Patientenzellen (M1-M11) im Vergleich nach 48h Behandlung mit einer Konzentration von 500 nM AZD 4320 (dualer BCL-2/XL-Inhibitor)
- Abb. 55** Apoptose-Induktion an PBMCs isoliert aus EDTA-Blut von neu-diagnostizierten AML-Patienten nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 5991
- Abb. 56** Relative Apoptoseraten der AML-Patientenzellen (M1-M11) im Vergleich nach 48h Behandlung mit einer Konzentration von 200 nM AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor)
- Abb. 57** Apoptose-Induktion an PBMCs isoliert aus EDTA-Blut von neu-diagnostizierten AML-Patienten nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 4573 (CDK-9-Inhibitor)
- Abb. 58** Relative Apoptoseraten der AML-Patientenzellen (M1-M11) im Vergleich nach 48h Behandlung mit einer Konzentration von 25 nM AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor)



- Abb. 59** Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4320 (dualer BCL-2-/XL-Inhibitor) bei der ALL-Zelllinie Jurkat (XTT-Assay)
- Abb. 60** Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) bei der ALL-Zelllinie Jurkat (XTT-Assay)
- Abb. 61** Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) bei der ALL-Zelllinie Jurkat (XTT-Assay)
- Abb. 62** A: Dosisabhängige Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der ALL-Zelllinie Jurkat nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 4320  
 B: Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten IC<sub>50</sub>  
 C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch)
- Abb. 63** A: Dosisabhängige Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der ALL-Zelllinie Jurkat nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 5991  
 B: Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten IC<sub>50</sub>  
 C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch)
- Abb. 64** A: Dosisabhängige Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der AML-Zelllinie HL-60 nach 48 Stunden Behandlung mit selektivem CDK-9-Inhibitor (AZD 4573)  
 B: Dosis-Effekt-Kurve mit der errechneten IC<sub>50</sub>  
 C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch)
- Abb. 65** Apoptose-Induktion an PBMCs isoliert aus Heparin-Blut von neu-diagnostizierten ALL-Patienten nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 4320 (BCL-2-/XL-Inhibitor)
- Abb. 66** Relative Apoptoseraten der ALL-Patientenzellen (L1-L6) im Vergleich nach 48h Behandlung mit einer Konzentration von 500 nM AZD 4320 (dualer BCL-2-/XL-Inhibitor)
- Abb. 67** Apoptose-Induktion an PBMCs isoliert aus Heparin-Blut von neu-diagnostizierten ALL-Patienten nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor)
- Abb. 68** Relative Apoptoseraten der ALL-Patientenzellen (L1-L6) im Vergleich nach 48h Behandlung mit einer Konzentration von 200 nM AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor)
- Abb. 69** Apoptose-Induktion an PBMCs isoliert aus Heparin-Blut von neu-diagnostizierten ALL-Patienten nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 4573 (CDK-9-Inhibitor)
- Abb. 70** Relative Apoptoseraten der ALL-Patientenzellen (L1-L6) im Vergleich nach 48h Behandlung mit einer Konzentration von 25 nM AZD 4573 (CDK-9-Inhibitor)

## II. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1</b>	WHO- Klassifikation der AML
<b>Tab. 2</b>	Einteilung der AML in Prognosegruppen nach Zyto-/Molekulargenetik (European LeukemiaNet)
<b>Tab. 3</b>	WHO-Klassifikation der ALL
<b>Tab. 4</b>	Überblick über die verwendeten Zelllinien
<b>Tab. 5</b>	Überblick über verwendeten Zellkulturmedien nach Zelllinien
<b>Tab. 6</b>	Überblick über Färbungen für Apoptose-Assays
<b>Tab. 7</b>	Festgelegte Signifikanzniveaus und p-Werte
<b>Tab. 8</b>	Gesamtüberblick IC <sub>25</sub> -, IC <sub>50</sub> - & IC <sub>75</sub> -Werte aller Zelllinien & Inhibitoren
<b>Tab. 9</b>	Klinische & epidemiologische Charakteristika der AML-Patienten-Kohorte
<b>Tab. 10</b>	Genetische Eigenschaften der AML-Patienten-Kohorte
<b>Tab. 11</b>	Klinische & epidemiologische Charakteristika der ALL-Patienten-Kohorte
<b>Tab. 12</b>	Zytogenetische Eigenschaften der ALL-Patienten-Kohorte

### III. Abkürzungsverzeichnis

<b>ABT-199</b>	Venetoclax	<b>FBS</b>	Fetales bovines Serum
<b>AG</b>	Arbeitsgruppe	<b>FITC</b>	Fluoreszein-Isothiocyanat
<b>ALL</b>	Akute lymphatische Leukämie	<b>FSC</b>	foward scatter
<b>AML</b>	Akute myeloische Leukämie	<b>h</b>	hours, Stunden
<b>APC</b>	Allophycocyanin	<b>HBSS</b>	Hanks Balanced salt solution
<b>ATRA</b>	All-trans-Retinolsäure	<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>AZD</b>	Abkürzung von AstraZeneca für deren Arzneimittel	<b>IC<sub>50</sub></b>	mittlere inhibitorische Konzentration
<b>AZD 4320</b>	Dualer Bcl-2/XL-Inhibitor	<b>k</b>	kilo
<b>AZD 4573</b>	Selektiver CDK9-Inhibitor	<b>kDa</b>	Kilo-Dalton
<b>AZD 5991</b>	MCL-1-Inhibitor	<b>KM</b>	Knochenmark
<b>Bcl-2</b>	B-cell-lymphoma 2	<b>MCL-1</b>	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein MCL-1
<b>BSA</b>	Bovines Serum-Albumin	<b>MDS</b>	Myelodysplastisches Syndrom
<b>bzw.</b>	beziehungsweise	<b>min</b>	Minuten
<b>CDK</b>	cyclin dependent kinase	<b>ml</b>	Milliliter
<b>CDK-9</b>	cyclin dependent kinase 9	<b>n</b>	nano
<b>CLL</b>	Chronisch lymphatische Leukämie	<b>nM</b>	nano-molar
<b>CML</b>	Chronisch myeloische Leukämie	<b>pB</b>	peripheres Blut
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid	<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cell
<b>DAC</b>	Decitabin	<b>PBS</b>	Phosphated-buffered saline
<b>DMEM</b>	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium	<b>PI</b>	Propidium-Iodid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>PMS</b>	Phenazinmethosulfat
<b>DSZM</b>	Deutsche Sammlung für Zellkulturen und Mikroorganismen	<b>PS</b>	Phosphatidylserin
<b>EU</b>	Europäische Union	<b>P-TEFb</b>	positiver Transkriptionelongationsfaktor b
<b>EMA</b>	Europäische Arzneimittelagentur	<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>ECR</b>	Electron coupling reagent	<b>rpm</b>	Rounds per minute
<b>FAB</b>	French American British	<b>SSC</b>	side scatter
<b>FACS</b>	Fluorescence activated cell sorting		

## IV. Abstract

**Hintergrund:** Bis heute existieren für die akute myeloische Leukämie - mit Ausnahme der PML - keine chemotherapeutischen Optionen mit zufriedenstellender Verbesserung der Gesamtüberlebensrate. Insbesondere bei älteren Erwachsenen liegen die Chancen auf Langzeitremissionen <10%. Spätestens durch die EU-weite Zulassung von Venetoclax in Kombination mit einem hypomethylierenden Agens (HMA) und die Aufnahme in die Behandlungsleitlinie für unfitte Patienten im Jahr 2021 erwies sich die Hemmung des anti-apoptotischen Proteins BCL-2 als effektive Strategie. An präklinischen AML-Modellen testeten wir drei neue selektive Inhibitoren, die (in-)direkt Proteine der BCL-2-Familie hemmen: den dualen BCL-2/XL-Inhibitor AZD 4320, den MCL-1-Inhibitor AZD 5991 und den CDK-9-Inhibitor AZD 4573 als indirekten MCL-1-Inhibitor.

**Methoden:** 4 AML-Zelllinien (MOLM-13, MOLM-14, OCI AML3 und HL-60), PBMCs aus Heparin-Blut/-Knochenmark von 11 neu-diagnostizierten AML-Patienten wurden mit den Inhibitoren, sowie in Kombination mit Decitabin als hypomethylierende Substanz behandelt. Die relative Apoptoserate wurde mittels Annexin-PI-Assays am FacsCalibur bestimmt (n=3), DMSO diente als Kontrolle. Die Zellviabilität/-proliferation unter Behandlung mit den Inhibitoren wurde XTT-basiert gemessen (n=6). Die PBMCs der Patienten wurden nach FICOLL-Protokoll aus Heparin-Blut isoliert.

**Ergebnisse:** Alle drei Inhibitoren induzieren zellspezifisch und konzentrationsabhängig Apoptose ( $p < 0,001$ ) und hemmen Zellviabilität/-proliferation ( $p < 0,001$ ) an den getesteten Zellmodellen. Durch Kombination mit Decitabin ergeben sich starke synergistische Effekte bei allen Inhibitoren, am stärksten ausgeprägt beim BCL-2-/XL-Inhibitor AZD 4320 und MCL-1-Inhibitor AZD 5991 (Steigerung Apoptoserate  $\emptyset +20\%$ , Verringerung IC50 um  $\emptyset -60,59\%$ ). AML-Patientenblasten zeigen ein Ansprechen auf alle drei getesteten Inhibitoren, am sensitivsten auf den CDK-9-Inhibitor AZD 4573.

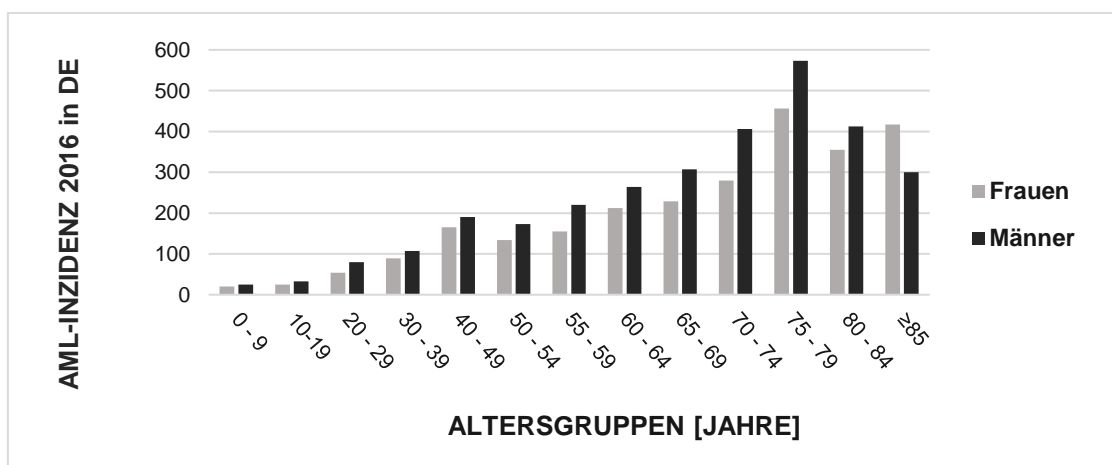
**Schlussfolgerung:** Die vorliegende Arbeit bietet eine Rationale für die klinische Testung der drei Inhibitoren an Patienten mit AML als Monotherapie, wie auch in Kombination mit hypomethylierenden Substanzen.

# 1. Einleitung

## 1.1. Akute myeloische Leukämie (AML)

Die akute myeloische Leukämie ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems. Sie entsteht durch Transformation hämatopoetischer Stammzellklone myeloischen Ursprungs im Knochenmark und ist abzugrenzen von der akut-lymphatischen Leukämie (ALL, s. 1.8.), bei welcher lymphatische Zellklone ursächlich sind. [1]

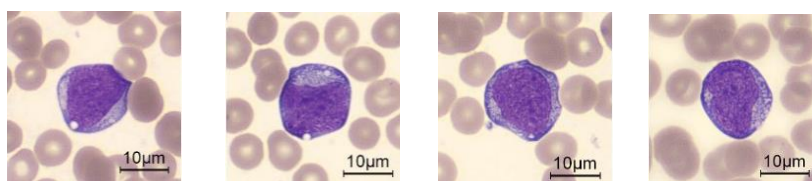
Epidemiologisch betrachtet sind akute Leukämien mit einem durchschnittlichen Anteil von 1,1% an allen Krebsneuerkrankungen seltene maligne Neoplasien. [2] Die AML ist nach der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) die zweithäufigste Leukämie des Erwachsenen. In Deutschland erkranken jährlich 3,7 Personen pro 100.000 Einwohnern bei einem medianen Erkrankungsalter von 72 Jahren an der AML (vgl. Abb. 1), sodass es sich um eine Erkrankung des fortgeschrittenen Erwachsenenalters handelt. Insbesondere bei älteren, unfitten Erwachsenen mit Komorbiditäten bleibt die Prognose und die relative Überlebensrate äußerst schlecht und liegt bei 10%. [3]. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (Verhältnis m:w 1,3:1) [4]



**Abb. 1: AML-Inzidenz 2016 in Deutschland ([2]):** altersabhängige Zunahme der AML-Inzidenz im Jahr 2016 in Deutschland mit Maximum in der Altersgruppe der 75-79-jährigen

Besondere Patientengruppen, speziell solche, die exogenen knochenmarksschädigende Noxen ausgesetzt waren, erkrankten gehäuft an der AML. Als sicher karzinogen gelten radioaktive Strahlung (Inzidenzzunahme in Hiroshima und Nagasaki nach Atombombenabwurf bei Überlebenden [5]), Rauchen [6], Benzol-Exposition und vorangegangene Chemotherapien, insbesondere mit Alkylantien, wie Cyclophosphamid und Topoisomerase-II-Inhibitoren, wie Etoposid. [7] Andere hämatologische Erkrankungen aus dem myeloproliferativen und myelodysplastischem Formenkreis stellen einen weiteren unabhängigen Risikofaktor dar: So gehen z.B. bis zu 50% aller Myelodysplastischen Syndrome (MDS) sekundär in eine AML über. Oft existieren morphologische und zytogenetische Überlappungen zwischen den Erkrankungen. [8]

Indizien für eine AML können sich in der klinischen Untersuchung z.B. durch Hepatosplenomegalie, Fremdorgan-Manifestationen, wie Gingivahyperplasie, oder durch Auffälligkeiten im Blutbild (Anämie, Thrombozytopenie, Granulozytopenie, ggfs. Leukozytose) ergeben. [9] Für die Diagnose ist in erster Linie die lichtmikroskopische Beurteilung von May-Grünwald-Giemsa-gefärbten Blutausstrichen und/ oder Knochenmark-Aspiraten ausschlaggebend. Als gesichert gilt die Diagnose, wenn leukämische Blasten einen Anteil von in der Regel  $>20\%$  an der Leukozytengesamtzahl in peripherem Blut oder im Knochenmark ausmachen. (vgl. Abb. 3). Diese Grenzen gelten gleichermaßen bei der Immunphänotypisierung mittels FACS-Durchflusszytometrie. Sie schließt sich i.d.R. als nächster diagnostischer Schritt an und beweist die Linienabstammung der Tumorzellen. Anhand der Cluster of differentiation-Oberflächenmarker erfolgt die Kategorisierung der Blasten: bei myeloischem Ursprung ist die Expression von MPO, CD13, CD33, u./o. CDw65 typisch. [1]



**Abb. 2: AML- Blasten vor Erythrozyten in May-Grünwald-Giemsa (Pappenheim)-gefärbten Differential-Blutausstrichen:** die Blasten zeigen den typischen schmalen, basophilen Zytoplasmasaum, sowie atypische Nukleoli. (Referenz: eigene Bilder, angefertigt in der MTA-Schule, Katharinenhospital Stuttgart).

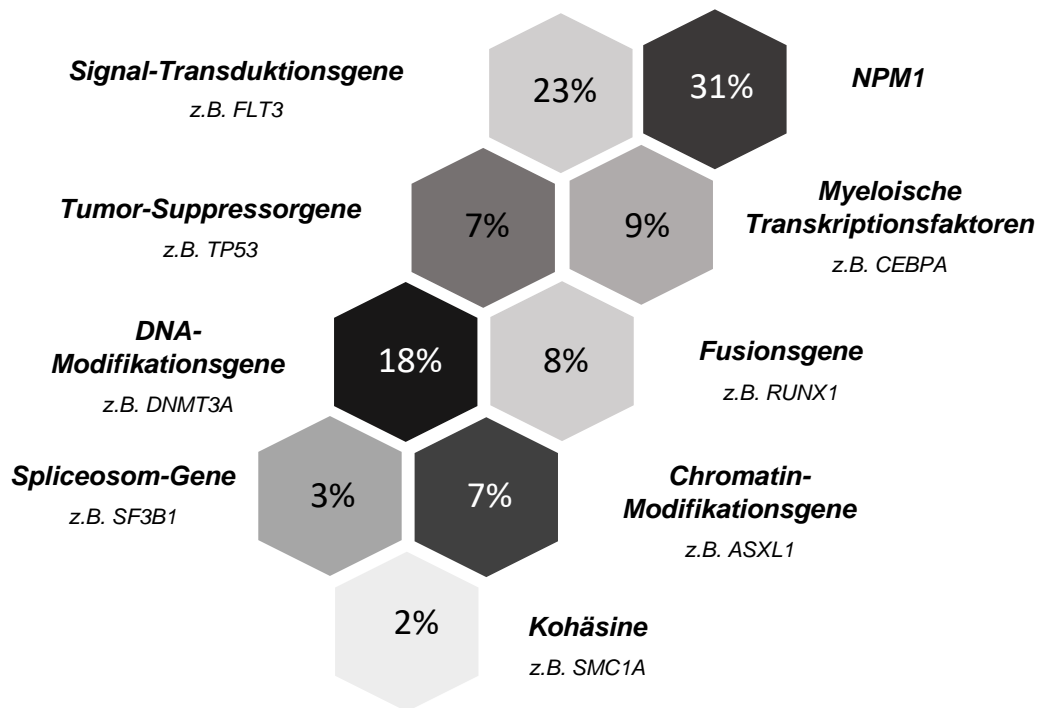
Eine weitere diagnostische Säule bilden molekular- und zytogenetische Methoden. Sie tragen nicht nur zur Stadieneinteilung (vgl. Tab. 1) bei, sondern dienen als prognostischer Faktor (vgl. Tab. 4). Außerdem können sie Angriffspunkt für zielgerichtete Chemotherapeutika sein.

Bei neu-diagnostizierten AML konnten in den letzten Jahren über 250 verschiedene genetische Mutationen identifiziert werden [10] (vgl. Abb.3). Von diesen sind aber nur wenige, typischerweise mindestens 2 Treiber-Mutationen pro Patient für die leukämische Transformation entscheidend. [11, 12]

**Tab. 1: WHO-Klassifikation der AML (2016) [13]**

AML-„Gruppe“ (rel. Häufigkeit)	Subtypen
<b>andere Formen der AML, nicht anders klassifiziert</b>	Minimal differenzierte AML (FAB M0) AML ohne Ausreifung (FAB M1) AML mit Ausreifung (FAB M2) Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4) Akute monozytäre/-blastäre Leukämie (FAB M5) Akute Erythroleukämie (FAB M6) Akute megakaryoblastäre Leukämie (FAB M7) Akute Basophilen-Leukämie
<b>AML mit wiederkehrenden genetischen Veränderungen</b>	APL mit PML::RARA Fusion AML mit RUNX1::RUNX1T1 Fusion AML mit CBFβ::MYH11 Fusion AML mit DEK::NUP214 Fusion AML mit RBM15::MRTFA Fusion AML mit BCR::ABL1 Fusion AML mit KMT2A rearrangement AML mit MECOM rearrangement AML mit NUP98 rearrangement AML mit NPM1 mutation AML mit CEBPA mutation AML, MDS AML mit anderen genetischen Veränderungen

° = provisorische Entität



**Abb. 3 [adaptiert nach [10], basierend auf Daten von [14]]: Mutationen in de-novo-AML:** Überblick über verschiedenen Genmutationsklassen und dazugehörigen Gene, sowie ihre relativen Häufigkeiten in de-novo aufgetretenen AML.

Anfang der 2000er-Jahre unterteilten Gilliland und Griffin diese Driver-Mutationen in Überleben-steigernde Klasse-I-Mutationen, z.B. *aktivierende Mutationen in Genen der Signaltransduktion* FLT3, KIT, KRAS oder NRAS, sowie Klasse-II-Mutationen, die die Ausdifferenzierung des malignen Zellklons hemmen, z.B. RUNX1 (*t(8;21)*), CEBPA, PML-RARA (*t(15;17)*), MYH11-CBFB (*inv (16)*). [15] Aufgrund des enormen Wissensgewinnes durch genetische Analysen in den letzten Jahren gilt die Gilliland-Griffin-Einteilung als überholt. Papaemmanuil et al. propagierten 2016 anhand ihrer prospektiven Kohortenstudie ein neues Klassifikationsmodell für die AML anhand verschiedener genetischer Subgruppen: Die NPM1-positive AML als häufigste Untergruppe mit einem Anteil von 27% tritt nur als Co-Mutation auf und ihre Prognose stark abhängig von der zweiten „Driver“-Mutation, z.B. DNMT3A oder FLT-3. Weitere Gruppen sind Patienten mit Mutationen in Chromatin-/RNA-Splicing-Regulatoren bzw. beiden (18%), Patienten mit TP53-Mutationen, IDH2<sup>R172</sup>-Mutationen (1%) und AML ohne detektierbare Treiber-Mutation.[12] [16] Eine reine Fokussierung auf genetische Merkmale ist sicherlich nicht ausreichend: nicht-genetische Prozesse, wie die



Dysregulierung von bestimmten Proteinen in der Zelle, z.B. BCL-2 oder MCL-1, scheinen für die Leukämogenese ebenfalls eine entscheidende Rolle zu spielen.

Die AML-Therapie bei fiten Patienten ist kurativ-intendiert und gliedert sich formal in eine Induktionsphase (*first-line*) zum Erzielen einer möglichst kompletten Remission der leukämischen Blasten und Postremissions-/Konsolidierungstherapien (*second-line*) zur Aufrechterhaltung der Blastenremission. Eine weit akzeptierte Induktionstherapie ist das sogenannte 7+3-Schema. Diese entspricht sieben Tage kontinuierlicher Therapie mit Cytarabin und an drei Tagen zusätzlich Dauno- oder Idarubicin als Antrazyklin. [17] Es gibt Modifikationen dieses Schemas, z.B. CPX-351, liposomal-ummanteltes Ara-C plus Daunorubicin im Verhältnis 5:1, mit Zulassung für den Einsatz bei für sekundären AML, [18, 19], Midostaurin als Zusatz zur Standard-Chemotherapie bei FLT3-mutierter de-novo-AML [20] oder Gemtuzumab Ozagamicin (GO), ein monoklonaler Antikörper für die CD33+-AML, in Kombination mit Standard-Chemotherapie. [21].

**Tab. 2: European LeukemiaNet (ELN)-Einteilung der AML in Prognosegruppen nach Zyto-/Molekulargenetik [22]**

Risikogruppe	genetische Aberrationen
<b>Günstig (Niedrigrisiko)</b>	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 Mutiertes NPM1 ohne FLT3-ITD oder mit FLT3-ITD <sup>niedrig</sup> Biallelisch mutiertes CEBPA
<b>Intermediär (mittleres Risiko)</b>	Mutiertes NPM1 mit FLT3-ITD <sup>hoch</sup> Wildtyp-NPM1 ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp) oder mit FLT3-ITD <sup>niedrig</sup> (ohne ungünstige genetische Aberrationen) t(9;11)(p22;q23); MLLT3-KMT2A§ Zytogenetische Aberrationen, die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft wurden
<b>Ungünstig (Hochrisiko)</b>	t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 t(v;11)(v;q23); KMT2A-Genumlagerung t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); GATA2, MECOM (EV11) -5 oder del(5q); -7; -17/abnl(17p) komplexer Karyotyp (≥3 Aberrationen) monosomaler Karyotyp (eine Monosomie, assoziiert mit mindestens einer weiteren Monosomie oder einer anderen strukturellen, chromosomalen Aberration (außer CBF-AML)) Wildtyp-NPM1 mit FLT3-ITD <sup>hoch</sup> Mutiertes RUNX1 Mutiertes ASXL1 Mutiertes TP53 AML aus MDS

Abhängig vom jeweiligen Patienten-Risikoprofil (vgl. Tab. 2) schließen sich entsprechende Postremissions-/Konsolidierungstherapien an.

In der günstigsten Prognosegruppe kann hochdosiertes Cytarabin zum Einsatz kommen. [23] Ab einem mittleren Risiko sollte eine konsolidierende allogene Stammzelltransplantation in Betracht gezogen werden.

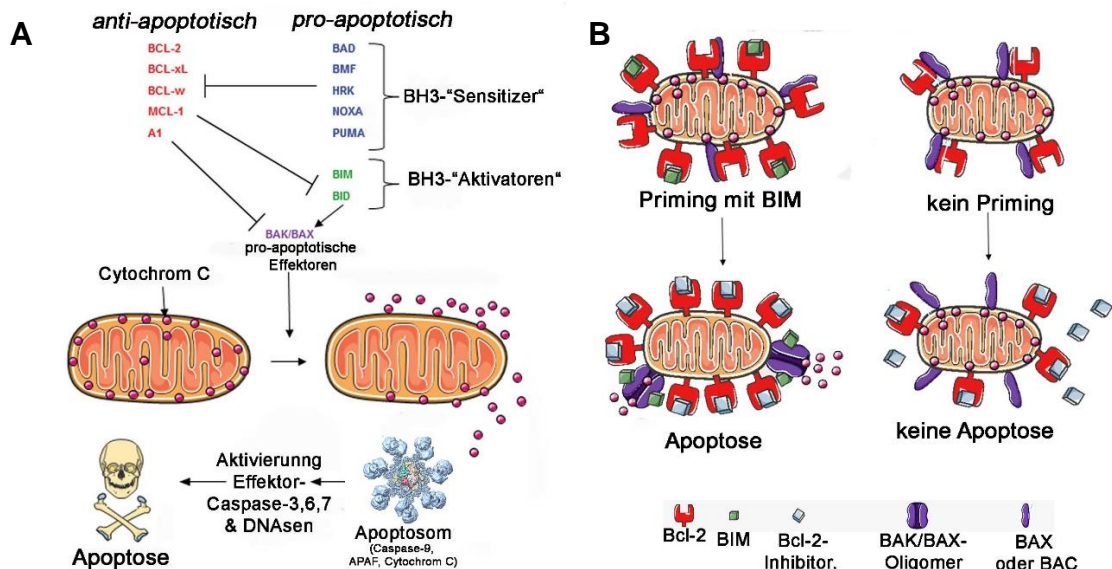
Da sich die AML aber vor allem bei älteren Patienten manifestiert, können oftmals aufgrund der Komorbiditäten – aber auch aufgrund genetischer und klinischer Risikofaktoren oder infektiologischen Komplikationen - keine intensiven Therapieregime durchgeführt werden. In diesen Fällen bietet sich eine palliativ-intendierte Therapie mit den hypomethylierenden Substanzen Decitabin oder Azacitidin an. Diese sind zytoreduktiven Behandlungen mit Hydroxyurea oder niedrig-dosiertem Cytarabin überlegen und das Gesamtüberleben kann signifikant um mehrere Monate verlängert werden. [24, 25] Neue Medikamente, wurden in den letzten Jahren (zumeist als Add-On zur Standardtherapie) in dieser Indikation zugelassen, wie der IDH-2-Inhibitor Enasidenib [26], der Hedgehog-Inhibitor Glasdegib [27] oder der BCL-2-Inhibitor Venetoclax (vgl. Punk 1.2).

Alle hier beschriebenen Erläuterungen zur Therapie beziehen sich *nicht* auf die akute Promyelozytenleukämie (FAB M3, t(15;17)) Hier besteht mit Arsentrioxid (ATO) plus All-trans-Retinsäure (ATRA) ein spezieller kurativer Ansatz. [28]

Trotz der therapeutischen Verbesserungen können heute nur etwa 30% der AML-Patienten, über alle Altersgruppen verteilt, dauerhaft „geheilt“ werden. [2] Neben einer primären Therapierefraktärität ist vor allem das Rezidivpotential nach initialer Blasten-Remission ein Problem: Pathomechanisch stellt man sich vor, dass ein oder mehrere therapierefraktäre Leukämieklone, gegebenenfalls auch unterhalb der Nachweisgrenze überleben, die entweder schon vor Therapiebeginn existiert haben können, oder aber auch erst durch die Therapie selbst induziert bzw. herausselektiert wurden und sich hieraus sukzessiv das klinische Rezidiv manifestiert. [29] Weitere Grundlagenforschung zur Detektion und zur Überwindung der Resistenzmechanismen wird für die therapeutischen Optionen zukünftig wegweisend sein.

## 1.2. BCL-2-Proteinfamilie

Bei der BCL-2-Proteinfamilie handelt es sich um verschiedene Proteine, die an der Regulation der zellulären Apoptose beteiligt sind. Die pro-apoptotischen Vertreter der Gruppe, wie u.a. BAX, induzieren die Einleitung des intrinsischen Wegs der Apoptose, indem Cytochrom C aus Mitochondrien freigesetzt wird. Dieses wiederum bildet mit Caspase 9 und Apaf den Apoptosom-Komplex, über den die Zelle über Caspasen und DNAsen Aktivierung in die Apoptose überführt wird [30, 31]. Die anti-apoptotischen Vertreter, BCL-2 selbst, MCL-1, BCL-xL, BCL-w und BFL-1, unterdrücken die Apoptose-Induktion, fördern somit gleichermaßen Überleben, wie Apoptose-Resistenz. Bei Aktivierung werden die verschiedenen Vertreter in die innere bzw. äußere Mitochondrienmembran rekrutiert. [32]



**Abb. 4:** [nach [33]]: A Über Proteine der BCL-2-Familie-vermittelte intrinsische Weg der Apoptose, B: Einfluss des Primings mit BIM auf den Therapie-Erfolg von BCL-2-Inhibitoren.

Ein Schlüsselmechanismus vieler maligner Erkrankungen ist es, auf unterschiedliche Weise die zelluläre Apoptose zu umgehen. Insbesondere die anti-apoptotischen Vertreter der BCL-2-Proteine sind bei vielen hämatologischen Neoplasien überexprimiert. [31] Bereits vor über 30 Jahren wurde die Translokation des BCL-2-Gens von Chromosom 14 auf Chromosom 18 (t(14;18)), welche zur BCL-2-Überexpression führt, als Pathomechanismus des folliculären Lymphoms identifiziert. [34] Auch bei der ALL konnte eine

Abhängigkeit von BCL-2 belegt werden. So korreliert die BCL-2-Expression positiv mit schwerer klinischer Symptomatik, hoher Blastenzahl im Knochenmark [35] und schlechtem Therapieansprechen [36]. Bei der AML ist es zunächst weniger offensichtlich, dass BCL-2-Inhibition einen klinisch erfolgreichen Ansatz zur Therapie bietet. [37] Eine alleinige Reduktion der BCL-2-Expression brachte unzufriedenstellende Ergebnisse. [38] Ausschlaggebend für die Sensitivität von BCL-2-Inhibitoren bei der AML ist die hohe Menge an so genannten „geprimten“ BCL-2, also BCL-2, welches proapoptisches BIM oder BAX gebunden hat. Del Poeta et al. konnten zeigen, dass dieses geprimte BCL-2 in AML-Blasten im Vergleich zu anderen gesunden Zellen deutlich erhöht ist (vgl. Abb. 4). Durch die hohen BIM-/BAX-Konzentrationen kann nach Bindung des BCL-2-Inhibitors an BCL-2 rasch durch Verlust der Integrität der Mitochondrienmembran Cytochrom C freigesetzt werden und die Zelle in Apoptose überführt werden. Dies könnte den Therapieerfolg erklären. [39, 40] In den meisten nicht-malignen Zellen ist BCL-2 nicht geprimed. Ausnahme sind Lymphozyten, weshalb Lymphopenien häufig als Nebenwirkungen von BCL-2-Inhibitoren zu beobachten sind. [41]

### **1.3. BCL-2-Inhibitoren**

BCL-2-Inhibitoren sind small molecule-Inhibitoren, die Motive der BH3-Domäne der proapoptischen BCL-2-Vertreter imitieren und über diese an die antiapoptischen BCL-2-Proteine binden. Erste BCL-2-Inhibitoren wurden ab 2005 entwickelt, u.a. ABT-737 mit schlechter oraler Bioverfügbarkeit [42] oder ABT-263 (Navitoclax), der neben BCL-2, BCL-X<sub>L</sub> und BCL-w inhibiert. Durch Hemmung der BCL-X<sub>L</sub>-Untereinheit, welche essentiell für das Überleben von Megakaryozyten ist [43], entstanden unter Navitoclax starke Therapieassoziierte, dosislimitierende Thrombozytopenien und der Inhibitor verpasste die Zulassung [44]. Interessanterweise verursacht der in unseren Experimenten verwendete BCL-2/X<sub>L</sub>-Inhibitor (AZD 4320) laut einer 2020 veröffentlichten Publikation lediglich eine vorübergehende, bereits nach wenigen Tagen komplett regrediente Thrombozytopenie, die nicht dosis-limitierend ist. [45] Entsprechend untersuchten wir AZD 4320 als dualen BCL-2/X<sub>L</sub>-Inhibitor mit - verglichen zu selektiven BCL-2-Inhibitoren - potenziertem antileukämischem Potential bei deutlich minimiertem Nebenwirkungsprofil.

Ein anderer Weg zur Verbesserung der Verträglichkeit erfolgte durch die Entwicklung spezifischer BCL-2-Inhibitoren, die nicht die BCL-X<sub>L</sub>-Untereinheit inhibieren. So wurde ABT-199 (Venetoclax) als erster selektiver BCL-2-Inhibitor etabliert. [46] Die erste Phase-1-Venetoclax-Monotherapie-Studie an CLL & NHL-Patienten mit schlechter Prognose zeigte beeindruckende Erfolge; 79% sprachen auf die Therapie an. [47] Präklinisch konnte auch bei der AML Apoptose im niedrigen nanomolaren Bereich durch Venetoclax erzielt werden. [48] In einer 2016 durchgeführten klinischen Phase-II-Monotherapie-Studie mit Patienten, die nicht fit genug für eine Induktionschemotherapie gewesen wären, wurde durch Venetoclax immerhin in 19% eine Blastenremission erreicht. In der Gruppe der IDH1-/2-Mutationen war der Anteil mit 33% nochmals höher. [49] Warum nur eine relativ kleine Subgruppe von Patienten auf die Therapie anspricht, ist Gegenstand aktueller Forschung und entscheidend für eine Therapie-Verbesserung. Eine mögliche Erklärung lieferten Carter et al., die zeigten, dass sich diese Resistenz durch zeitgleiche Inhibition von BCL-2 und MCL-1 aufheben lässt: vormals Venetoclax-resistente AML-Blasten und -Stammzellen wurden durch die simultane Hemmung in Apoptose geführt. Wahrscheinlich ist das Zusammenspiel aller BCL-Proteinfamilienmitglieder für die BCL-2-Resistenz entscheidend. [50].

#### **1.4. MCL-1-Inhibitoren**

MCL-1-Inhibitoren gehören zu den small-molecule-Inhibitoren. MCL-1 ist ein weiteres anti-apoptotisches Protein der BCL-2-Familie. Es besitzt eine kurze Halbwertszeit und wird in verschiedenen Geweben exprimiert. MCL-1 scheint eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung zu spielen, da gezeigt werden konnte, dass Mausembryos mit MCL-1-Deletion nicht überlebensfähig sind. Weitere Funktionen umfassen Entwicklung von B-/T-Lymphozyten und Neuronen, sowie Steuerung des Überlebens von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, hämatopoetischen Stammzellen und Fibroblasten in der Synovia. [51] [52]

Das MCL-1-Gen ist dabei eines der am häufigsten in menschlichen Krebszellen amplifizierten Gene. [53] Verschiedene Tumor-Entitäten wurden als MCL-1-abhängig beschrieben, so auch die AML. [54]

Außerdem trägt dysreguliertes MCL-1 zu einer Vielzahl von Resistenzen bei verschiedenen Chemotherapeutika bei [55] [56], interessanterweise auch zur Venetoclax-Resistenz. [57, 58] (vgl. 1.3.) Einer der ersten MCL-1-Inhibitoren war Maritoclax. [59] Mehrere neue MCL-1-Inhibitoren, wie S63845, der hier in der Arbeit verwendete AZD 5991 oder AMG-176 werden in klinischen Studien untersucht (NCT02979366, NCT03218683, NCT02675452). Die klinische Studie zum hier untersuchten AZD 5991 in den USA untersucht die Wirkung des MCL-1-Inhibitors als Monotherapie, sowie in Kombination mit Venetoclax bei AML-, MDS- und Plasmozytom-Rezidiven. [60]

### **1.5. CDK-9-Inhibitoren**

CDK-9-Inhibitoren sind small-molecule-Inhibitoren und reprimieren MCL-1-indirekt auf Transkriptionsebene: CDK-9 bindet an Cyclin T1 (CycT) und bildet gemeinsam mit diesem den Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb), der die nicht-ribosomale Transkription und mRNA-Reifung reguliert. [61] Ein Gen, das von P-TEFb vermehrt kontrolliert wird, ist MCL-1. [62] [63] CDK-9-Inhibitoren werden daher als indirekte MCL-1-Inhibitoren evaluiert.

CDK-9 ist an der Zelldifferenzierung von Muskelzellen, Neuronen und Monozyten beteiligt. In Monozyten scheint es anti-apoptotisch zu wirken. Im Gegensatz zu anderen Cyclin-abhängigen Kinasen, wie CDK-4 oder CDK-6, spielt CDK-9 allerdings keine primäre Rolle bei der Regulation des Zellzyklus. [61]

Erste klinisch getestete, nicht-spezifische CDK-9-Inhibitoren, wie Alvocidib (Flavopiridol) & Dinaciclib besitzen ungünstige Nebenwirkungsprofile, die möglicherweise auf eine nicht-selektive Inhibition von CDK9 zurückzuführen sein könnten. [64] Der hier verwendete CDK-9-Inhibitor AZD 4573 zeigt eine verbesserte CDK-9-Selektivität und befindet sich in den USA in einer Phase-I-Studie für verschiedene hämatologische Erkrankungen. [65]

## 1.6. Decitabin (DAC)

DAC ist ein Zytostatikum, das als Antimetabolit wirkt. Chemisch betrachtet handelt es sich um ein Pyrimidin-Analogon. Es wird als falscher Baustein in DNA und RNA integriert und hemmt so DNA-Methyltransferasen. [66] Zum Wirkmechanismus stellt man sich vor, dass methylierte (und dadurch deaktivierte) Tumorsuppressoren wieder eine Reaktivierung durch eine Demethylierung erfahren (s. S.13). Decitabin wirkt somit rein epigenetisch im Gegensatz zu den „klassischen Zytostatika“. Effekte treten zeitverzögert nach durchschnittlich zwei (oder mehr) Zyklen mit Decitabin ein. [67]

## 1.7. Akute lymphatische Leukämie (ALL)

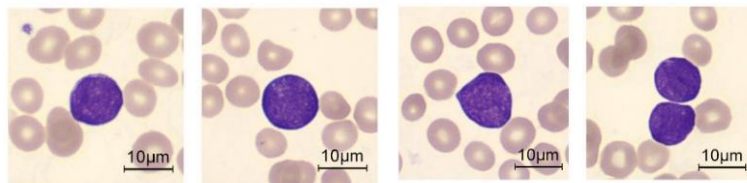
Wie unter 1.1. beschrieben, ist die Transformation eines lymphatischen Stammzellklons im Knochenmark der zugrundeliegende Pathomechanismus bei der Entstehung der ALL. Mit einem Gesamtanteil von 29,7% stellt sie die häufigste bösartige Tumorerkrankung bei Kindern dar. Erwachsene sind 4-mal seltener betroffen (Inzidenz: 1,5/100.000/Jahr), haben aber schlechtere Überlebenschancen (ca. 30-40% [68] vs. 91%) Das Geschlechter-Verhältnis entspricht dem der AML. [69] [70]

**Tab. 3: WHO-Klassifikation der ALL (2016) [13]**

ALL-„Gruppe“	Subtypen
<b>Lymphatische-Vorläufer-Zellneoplasien</b>	B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom, nicht anders klassifiziert B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit definierten zytogenetischen Chromosomenbefunden/genetischen Abnormitäten <ul style="list-style-type: none"> <li>• B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1</li> <li>• B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit t(v;11q23); KMT2A rearranged</li> <li>• B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit t(12;21)(p13;q22); ETV6-RUNX1</li> <li>• B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit Hypodiploidie</li> <li>• B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit Hyperdiploidie</li> <li>• B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit t(5;14)(q31;q32);IL3-IGH</li> <li>• B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1</li> <li>• B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit BCR-ABL1-like</li> <li>• B-lymphoblastische Leukämie/Lymphom mit iAMP21</li> </ul> T-lymphoblastische Leukämie/Lymphom <ul style="list-style-type: none"> <li>• Frühe T-Zell-Precursor lymphoblastische Leukämie</li> <li>• Natürliche-Killer-(NK)-Zell lymphoblastische Leukämie /Lymphom</li> </ul>
<b>Reife B-Zell-Neoplasien</b>	Reifzellige Burkitt B-ALL

Klinische Manifestationen können u.a. in einer Lymphadenopathie, Knochenschmerzen, Kopfschmerzen bei Meningeosis leucaemica oder analog zur AML als Verdrängung der gesunden Hämatopoese mit Anämie, Granulozytopenie (ggfs. Leukozytose) und/oder Thrombozytopenie bestehen. Mehr als 20% lymphozytäre bzw. undifferenzierte Blasten im Verhältnis zur Leukozytengesamtzahl im Knochenmarkaspirat oder bei der Immunphänotypisierung mittels FACS-Durchflusszytometrie sind diagnostisches Kriterium. [71] Bei T-zellulärer Abstammung exprimieren sie CD3, u./o. CD7 als Oberflächenmarker, bei B-Zell-Abstammung CD19, CD22, u./o. CD79a. [1]

Weiterführende genetische Untersuchungen komplettieren die Diagnostik. In über 60% finden sich zytogenetische Abberationen, u.a. das Philadelphia-Chromosom t(9;22), welches bei Erwachsenen in etwa bei einem Viertel aller Vorläufer-B-ALL nachgewiesen werden kann und mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. [72]



**Abb. 5: ALL- Blasten vor Erythrozyten in May-Grünwald-Giemsa (Pappenheim)-gefärbten Differential-Blutausstrichen** (Referenz: eigene Bilder, angefertigt in der MTA-Schule, Katharinenhospital Stuttgart).

Die Behandlungskonzepte sind komplexer als bei der AML und lehnen sich an Studienprotokolle bzw. Empfehlungen der Studiengruppen an, z.B. der GMALL. [73] Patienten mit dem t(9;22)-BCR-ABL-Fusionstranskript profitieren von BCR-ABL- Tyrosinkinaseinhibitoren. [74] [9]



## 1.8. Fragestellung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden systematisch drei neue BCL-2-assoziierte-Inhibitoren auf ihr antileukämisches Potenzial untersucht: der duale BCL-2/X<sub>L</sub>-Inhibitor AZD 4320, der MCL-1-Inhibitor AZD 5991 und der CDK-9-Inhibitor AZD 4573.

Ziel der Arbeit, war es, die Sensitivität der Inhibitoren in verschiedenen AML-Zellmodellen zu evaluieren und diese durch Messung der Zellproliferation bzw. Ermittlung der Apoptoserate unter verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen zu quantifizieren. Zusätzlich wurden zell- und Inhibitor-spezifische IC<sub>50</sub>-Werte berechnet. Als Modelle dienten neben Zelllinien native Blasten aus Heparinblut und Knochenmark.

Entsprechend der Zulassung von Venetoclax mit hypomethylierenden Substanzen [75] untersuchten wir die Hypothese, ob eine Kombinationsbehandlung der Inhibitoren mit DAC synergistisches Potential aufzeigt.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Inhibitoren ein entsprechendes Ansprechen ex-vivo zeigen würden, haben wir unsere Versuche um die Testung von AML-Patientenblasten aus Heparin-Blut/-Knochenmark erweitert.

In Translation und als mögliches zukünftiges Anwendungsgebiet der BCL-Inhibitoren wurden die genannten Inhibitoren in in-vitro, sowie ex-vivo-ALL-Modellen untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Verbrauchs-/Einwegmaterialien

FACS- Röhrchen (Round-Bottom Tubes)	BD
Falcon™ 6-well-Platten	Fisher Scientific
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, 15ml	Fisher Scientific
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, 50ml	Fisher Scientific
Falcon™ Zellkulturflaschen (12,5cm <sup>2</sup> , 25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> )	Fisher Scientific
Falcon™ Einwegpipetten (2,5ml 5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Fisher Scientific
Nalgene™ Oak Ridge Zentrifugenröhrchen	Fisher Scientific
CryoTube™ Vials-Kryoröhrchen	Thermo Scientific
12-well-Platten	Corning Inc.
Cellstar® 96-well-Platten	Sigma
PARAFILM® M, double size	Sigma
Pasteur capillary pipettes	WU Mainz
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Nerbe
Combitips® advanced, 5ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße „Eppis“ (0,2ml, 0,5ml, 1ml, 2ml)	Eppendorf
Entsorgungsbeutel, PP, autoklavierbar	BRAND
Peha-soft® nitrile guard powderfree-Handschuhe	Hartmann

#### 2.1.2. Zellkulturmedien und -zubehör

CoolCell®-Einfrierbox	Biocision
Mr Frosty-Gefrierbehälter	ThermoFisher
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement	ThermoFisher
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	ThermoFisher
OptiMem Serum Reduced Medium	GE
HyClone/ DMEM/High Modified Medium	Lifesciences
DMEM	Biochrom
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %)	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml / 10.000 µg/ml)	Biochrom
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Biochrom
Bicoll Separating Solution	Biochrom

Natrium-Pyruvat	Gibco
Fetales bovines Serum (FBS)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
PBS (ohne Calcium-/Magnesiumchlorid)	Sigma
Erythrozyten-Lysepuffer	c.c.pro

### 2.1.3. Laborgeräte

IX51-Invertmikroskop	Olympus
HERAcell 240i-Brutschrank	Thermo Scientific
HERAsafe-Sicherheitswerkbank	Heraeus
Varifuge 3.0 RS-Standzentrifuge	Heraeus
VIP Series -86°C-Kühlschrank	Sanyo
weitere Laborkühlschränke	verschiedene
FACSCalibur	BD
Sunrise-Mikroplattenlesegerät	Tecan
Zentrifuge 5415R	Eppendorf
verstellbare Pipetten (0,1-1µl, 1-10µl, 2-20µl, 10-100µl, 2-200µl, 100-1000µl)	Eppendorf
Pipetboy-Pipettierhilfe	INTEGRA
AT 261 deltaRange	Mettler
Reax top-Shaker	Heidolph
Vortex-Genie 2	Sci. Industries
3017 Schüttler	GFL
Mini-Fuge	Carl Roth
Vacunsafe-Absaugpumpe	Integra
Wasserbad	Köttermann

### 2.1.4. Software

GraphPad PRISM	GraphPad, Inc.
CellQuest	BD
Magellan™	Tecan
Office 365	Microsoft
JMP 14	SAS

### 2.1.5. Reagenzien

APC Annexin V	Apoptose	Biolegend
Propidium-Iodid		Invitrogen
Annexin V Binding Buffer		BD
Pharmingen FITC Annexin V		BD
FACSFlow Trägerflüssigkeit		BD
FACS™ Clean Solution		BD
FACS™ Rinse Solution		BD
Phenazinmethosulfat (ECR-Reagenz)		SigmaAldrich
XTT-Natriumsalz Biochemica	XTT	PanReacAppliChem

### 2.1.6. Inhibitoren

Die Inhibitoren AZD4573 (CDK-9-Inhibitor), AZD5991 (MCL-1-Inhibitor) und AZD4320 (BCL-2/X<sub>L</sub>-Inhibitor) wurden unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von AstraZeneca, USA, zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt. Die Lyophilisate wurden in DMSO gelöst (10mM-Lösung).

### 2.1.7. Heparin-Blut und -Knochenmark von Patienten

In Kooperation mit der Onkologischen Tagesklinik der Inneren Medizin II konnten Knochenmark-Aspirate bzw. peripheres Heparin-Blut von 11 neu-diagnostizierten AML-, sowie 6 ALL-Patienten/-innen vor Therapiebeginn gewonnen werden. Eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten/-innen zur Verwendung des Materials für Forschungszwecke, sowie ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen (Projektnummer 188/2018 BO2) liegen vor.

## 2.1.8. Zelllinien

**Tab. 4: Überblick über die verwendeten Zelllinien**

		<b>Eigenschaften</b>		<b>Herkunft</b>
<b>MOLM-13</b>	human	sekundäre AML (FAB M5a) aus MDS [76]	nicht-adhären	AG Dr. Heinrich, Oregon University, Portland, OR,
<b>MOLM-14</b>				
<b>OCI-AML3</b>	human	AML (FAB M4) [77]	nicht-adhären	DSMZ
<b>HL-60</b>	human	AML (FAB M2)	semi-adhären	DSMZ
<b>Jurkat</b>	human	T-ALL [78]	nicht-adhären	AG Prof. Salih, UKT Tübingen

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zellkultur

Die Zellen wurden in Kulturflaschen in den genannten Medien (s. Tab. 6) in einem 37°C-Brutschrank (95% relative Luftfeuchtigkeit, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Täglich erfolgte deren lichtmikroskopische Kontrolle. Bei Farbumschlag des Mediums und/ oder lichtmikroskopisch hoher Zelldichte, wurde eine Subkultivierung („Split“) im Verhältnis 1:10 oder an die Zellzahl angepasst vorgenommen. Die semiadhärenten HL-60 wurden zusätzlich enzymatisch mittels Trypsins vom Flaschenboden separiert. Falls nicht anders angegeben, erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 2000rpm. Die Zellen sind im zur Arbeitsgruppe gehörigen -80°C-Gefrierschrank zwischengelagert und anschließend in Flüssigstickstoff archiviert. Für den Einfrierprozess wurde spezielles „Freezing-Medium“ 50% (v/v ≙ 25ml/50ml) Medium pur, 40% ((v/v ≙ 20ml/50ml) FBS und 10% (v/v ≙ 5ml/50ml) DMSO) verwendet, und die Zellen in Kryoröhrchen in verschiedenen Zelleinfrierbehältern platziert, welche diese ca. 1°C/min erkalten lassen.

**Tab. 5: Überblick über verwendeten Zellkulturmedien nach Zelllinien**

Medium	Zelllinie
<b>Gibco®-RPMI *</b>	MOLM-13, MOLM-14, Jurkat, OCI-AML3, HL-60
<b>DMEM **</b>	PBMCs aus Patienten-Knochenmark/-Blut

\* für optimales Wachstum Zugabe von 10% FBS, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Natrium-Pyruvat, sowie 1% Penicillin/Streptomycin, \*\* entspricht \*, allerdings abweichend 20% FBS

### Bestimmung der Zellzahl

In der Neubauer-Zählkammer wurde die exakte Zellzahl in Zellsuspensionen bestimmt. Dazu wurden vier Großquadrate (je V = 0,1µl) unter dem Inversionsmikroskop nativ ausgezählt und über die genannte Gleichung auf die Gesamtzellzahl der Zellsuspension rückgeschlossen:

$$n_{\text{gesamt}} = \frac{n_{4 \text{ Großquadrate}}}{4} \cdot 10^4 \cdot V_{\text{gesamt}}$$

$n_{\text{gesamt}}$  = gesamte Zellzahl der Zellsuspension

$n_{4 \text{ Großquadrate}}$  = Zellanzahl in vier Großquadraten

$V_{\text{gesamt}}$  = Gesamtvolumen der Zellsuspension [ml]

### **2.2.2. Proliferations-/ Viabilitäts-Assays (XTT)**

In Mikrotiterplatten wurden pro „well“ 100µl Zellsuspension entsprechend 20 000 Zellen vorgelegt und in verschiedenen Konzentrationen mit den Inhibitoren AZD 4320, AZD 4573 und AZD 5991 behandelt. Unbehandelte Zellen dienen als Referenz. Nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation wurden jeweils 50µl Reagenz (Verhältnis 1:50 PMS (ECR): XTT) zu den Zellsuspensionen gegeben. Das gelbliche XTT (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid) wird durch NADH aus mitochondrialen Dehydrogenasen, u.a. aus dem Citratzyklus, zu einem orangenen, wasserlöslichen Formazan-Farbstoff reduziert. Diese Reaktion kann ausschließlich in lebenden Zellen ablaufen. Phenozinmethosulfat (PMS (ECR)) dient als Reduktionsmittel/Elektronenakzeptor und verstärkt die kolorimetrische Reaktion des XTT-Salzes. Die Extinktion ist direkt proportional zur NADH-Menge bzw. Anzahl der proliferierenden Zellen und wurde nach 4h photometrisch mittels Mikroplattenlesegerät bei 480nm gemessen. [79] Alle Messungen wurden sechsfach durchgeführt (n=6). Von den Messwerten wurde die durchschnittliche Extinktion des Mediums im jeweiligen Ansatz subtrahiert und anschließend die durchschnittliche Extinktion der unbehandelten Zellen als 100%-Proliferationsaktivität betrachtet.

### **2.2.3. Apoptose-Assays**

Die relative Anzahl apoptotischer Zellen in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentrationen (AZD4320, AZD4573, AZD5991 und/oder Decitabin) wurde in Verdünnungsreihen in 1 bzw. 2ml Zellsuspension in 6-/12-well-Platten bestimmt. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro well ausgesät. Inhibitoren wurden in DMSO gelöst. Um zu zeigen, dass der apoptotische Effekt nicht durch DMSO verursacht wird, wurde die Apoptoserate der Zellen unter DMSO als Kontrolle gemessen. Dabei wurde die Menge DMSO verwendet, welche in der höchsten Konzentration des jeweiligen Ansatzes enthalten war. Nach 48-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen innerhalb der „wells“ lichtmikroskopisch inspiziert und ggfs. Annexin-PI gefärbt (vgl. Tab. 6).

Die Annexin-PI-Färbung macht eine Unterscheidung zwischen nicht-, früh- und spät-apoptotischen Zellen möglich. Annexin bindet Phosphatidylserin (PS) Ca<sup>2+</sup>-abhängig. Phosphatidylserin ist Teil der zellulären Biomembran und wird in früh-apoptotischen Zellen vermehrt in den äußeren Membranlayer verschoben, wo es in-vivo als Signal zur Anlockung von Makrophagen dient. Propidiumiodid (PI), ein DNA-/RNA-interkalierender Farbstoff und Marker für die späte Apoptose, färbt Nukleinsäuren bei Integritätsverlust der Plasma-/ggfs. Nukleus-Membran (vgl. Abb. 7). Für die Färbung wurden die Zellen zentrifugiert, das Medium mittels Vakuumpumpe abgesaugt und je 100µl Färbelösung (FITC Annexin V bzw. APC Annexin V 1:20 und PI 1:50 verdünnt in Annexin V-Bindung Buffer) hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation (abgedunkelt, bei Raumtemperatur) erfolgte die Zugabe von 100µl Annexin V binding buffer und innerhalb einer Stunde die Messung am FACS-Gerät.

**Tab. 6: Überblick über Färbungen für Apoptose-Assays**

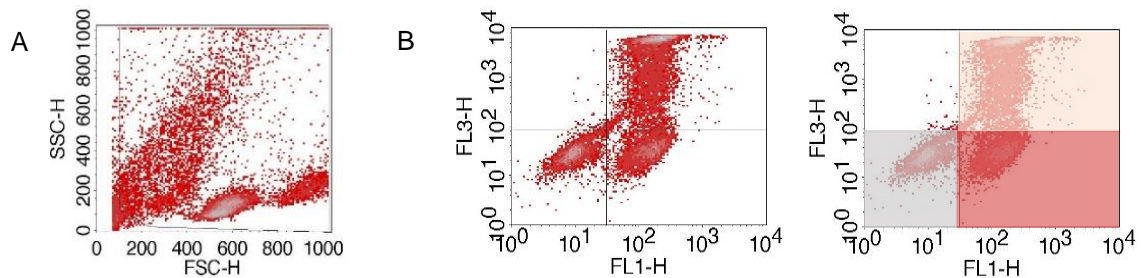
Zelllinien	Färbungen	
<b>Leukämie-Zelllinien</b>	FITC-Annexin V (grün) Emissionsmaximum: 520nm	PI Emissionsmaximum: 590nm
<b>PBMCs Patienten</b>	keine (Gating auf lebende Zellpopulation)	

\* Verwendung da transduzierte Zellen durch Plasmid-Einbau grüne Eigenfluoreszenz besitzen

Im FACS-Gerät passieren die Zellen umgeben von einer Trägerflüssigkeit einzeln eine Flusszelle, in der sie von einem Laser bestrahlt werden. Die Trägerflüssigkeit wiederum ist von der sogenannten Mantelflüssigkeit umgeben, die sicherstellt, dass die Zellen in der Trägerflüssigkeit senkrecht am Laser vorbeigeleitet werden. Diesen Vorgang nennt man hydrodynamische Fokussierung. Dabei entsteht Streulicht, das von zwei nachgeschalteten Detektoren gemessen wird: dem Vorwärtsstreulichtdetektor (FSC) und dem Seitwärtsstreulichtdetektor (SSC). Je größer eine Zelle ist, desto mehr Vorwärtsstreulicht verursacht sie. Je größer und je stärker granuliert die Zelle, desto mehr Seitwärtsstreulicht entsteht. Dies wird graphisch im Dotplot dargestellt, wobei die FSC-Signale als Abszisse (x) und die SSC-Signale als



Ordinate (y) aufgetragen werden (vgl. Abb. 7). [80] Zusätzliche Fluoreszenzkanäle FLT1-4 ermöglichen u.a. die Darstellung Annexin-/PI-positiver Zellen. Alle Messungen wurden zweifach wiederholt (n=3).



**Abb. 6:** Dotplot-Diagramme am FACS Calibur: A SSC-/FSC-Kanal, B Fluoreszenzkanäle für Annexin-PI-Färbung mit Darstellung der verschiedenen apoptotischen Phasen: grau = lebend, rot = frühe Apoptose, hellrot = späte Apoptose (Referenz: eigene Bilder, angefertigt im Labor Kampa-Schittenhelm, Med. Klinik II, Uniklinikum Tübingen)

#### 2.2.4. Isolierung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll®-Technik)

Peripheres Heparin-Blut bzw. Knochenmark-Aspirate von neu-diagnostizierten AML-/ALL-Patienten wurde(n) 1:1 mit PBS verdünnt und als separate Phase auf die Ficoll®-Trennlösung pipettiert. Das Gemisch wurde 20min bei 2000 rpm ohne Bremse (geringe Drehzahl beim Abstoppen ca. 1rpm/s) zentrifugiert. Mit einer Dichte von von 1,077g/ml lagert sich die Ficoll®-Lösung zwischen Erythrozyten, eosinophile/neutrophile Granulozyten auf der einen ( $\rho_{\text{Erythrozyten}} > \rho_{\text{eosinophile/neutrophile Granulozyten}} > \rho_{\text{Ficoll®-Lösung}}$ ) und leichteren PBMCs, basophilen Granulozyten auf der anderen Seite ( $\rho_{\text{Ficoll®-Lösung}} > \rho_{\text{PBMCs, basophile Granulozyten}} > \rho_{\text{Plasma}}$ ). Das oben aufschwimmende Plasma wurde verworfen, die PBMC-„Ring“-Interphase in ein neues Falcon®-Röhrchen überführt, mit PBS verdünnt und zentrifugiert.

Nach zwei PBS-Waschschritten, und ggfs. bei rotem Zellpellet Erythrozytenlyse, wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt, in DMEM-Kultur überführt und für die Apoptose-Versuche verwendet.

#### 2.2.5. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistik-Software JMP 14 und GraphPad Prism. Für Proliferations-, und Apoptose-Assays wurden einfaktorielle

Varianzanalysen (ANOVA) als Testverfahren, sowie Dunnett-Tests als Post-hoc-Analysen gewählt. Somit konnte erhoben werden, ob sich die Mittelwerte der relativen Apoptoseraten bei verschiedenen Konzentrationen signifikant von der unbehandelten Probe als Referenzgröße unterscheiden. Für die gesamte Arbeit wurden Signifikanzniveaus anhand der Größe des alpha-Fehlers definiert (vgl. Tab. 7). Der Alpha-Fehler beschreibt, die maximale-festgelegte Wahrscheinlichkeit eines wissenschaftlichen Tests, die Alternativhypothese fälschlicherweise anzunehmen, obwohl eigentlich die Nullhypothese zutrifft. Bezogen auf diese Arbeit, also die Wahrscheinlichkeit, dass die drei getesteten Inhibitoren, der BCL-2-/X<sub>L</sub>-Inhibitor, MCL-1-Inhibitor und CDK-9-Inhibitor bzw. in Kombination mit Decitabin, einen Effekt, also Apoptose-Induktion oder Proliferationshemmung, erzielen, obwohl sie dies in Wirklichkeit nicht tun. In diesem Aufbau wurden höchstens 5% als obere Grenze festgelegt. [81]

**Tab. 7: Festgelegte Signifikanzniveaus & p-Werte**

	Signifikanzniveau	p-Werte
****	$\alpha = 0,0001$	$p < 0,0001$
***	$\alpha = 0,001$	$p < 0,001$
**	$\alpha = 0,01$	$p < 0,01$
*	$\alpha = 0,05$	$p < 0,05$

Bei den Apoptose-Assays wurde für jede Zelllinie die IC<sub>50</sub>-Konzentration berechnet. Sie entspricht derjenigen Inhibitor-Konzentration, bei welcher 50% der Zellen apoptotisch sind. Die Kombinationsbehandlungen aus den Inhibitoren mit Decitabin wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalysen (two-way-ANOVA) über GraphPad ausgewertet. Dabei wurden die Mittelwerte der relativen Apoptoserate (Messvariable) in Abhängigkeit der zwei Variablen, einerseits der Konzentration der Inhibitoren als Einzelbehandlung (-DAC) oder Kombinationsbehandlung (+DAC) bzw. der Behandlung mit KM-Spender/AML-/ALL-Patienten miteinander verglichen. So wurden jeweils drei verschiedene Hypothesen getestet: erstens, sind die Mittelwerte der relativen Apoptoserate von den Konzentrationen der Inhibitoren abhängig; besteht also eine

konzentrationsabhängige Wirkung? Diese Abhängigkeit wird als Reihenfaktor beschrieben und bestand aufgrund des Testaufbaus stets ( $p < 0,0001$ ). Zweitens, sind die Mittelwerte der relativen Apoptoserate von Einzelbehandlung (-DAC) und Kombinationsbehandlung (+DAC) signifikant verschieden? Dieser als Säulenfaktor bezeichnete Zusammenhang hat in den durchgeführten Messungen die höchste Aussagekraft, da er Aufschluss über mögliche synergistische Effekte bzw. Effektivität der Inhibitoren gibt. Drittens, sind die beiden nominalen Variablen, also Konzentrationen der Inhibitoren, sowie Behandlungsart (-DAC/+DAC) voneinander abhängig? Besteht also eine Interaktion zwischen diesen? Je kleiner der Säulenfaktor-Absolutwert, desto unwahrscheinlicher ein Zusammenhang. Säulen- und Interaktionsfaktor sind an den entsprechenden Stellen angegeben.

Zur Darstellung des synergistischen Potentials von Inhibitoren und Decitabin wurden Isobologramme verwendet. Die Ordinate stellt Konzentrationen der Inhibitoren (y) und die Abszisse Konzentrationen von Decitabin (x) dar. Auf beiden Achsen wird der  $IC_{50}$ -Wert der Substanzen aufgetragen (alternativ & zusätzlich auch  $IC_{25/75}$ ) und dadurch eine Gerade mit negativer Steigung gezogen. Diese markiert die Grenze zwischen Antagonismus und Synergismus. Liegt der  $IC_{50}$ -Wert der Kombinationsbehandlung (AZD + DAC) unterhalb der Gerade, ist von einem synergistischen Verhalten, läge der Punkt über der Geraden von einem antagonistischen Verhalten der Substanzkombination auszugehen. Als Ergänzung wurden Kombinationsindices (CI) auf  $IC_{50}$ -,  $IC_{25}$ - und  $IC_{75}$ -Niveau über nachfolgende Gleichung berechnet:

$$CI = \frac{a}{A} + \frac{d}{D}$$

*a+d:  $IC_{25/50/75}$  (AZD + DAC) [nM]*

*A:  $IC_{25/50/75}$  (AZD) [nM]*

*D:  $IC_{25/50/75}$  (DAC) [nM]*

Ist  $CI = 1$  existiert kein Unterschied zwischen Einzel- und Kombinationsbehandlung, bei  $CI$ -Werten  $< 1$  wirken die Substanzen synergistisch und bei  $CI$ -Werten  $> 1$  antagonistisch.

### 3. Ergebnisse

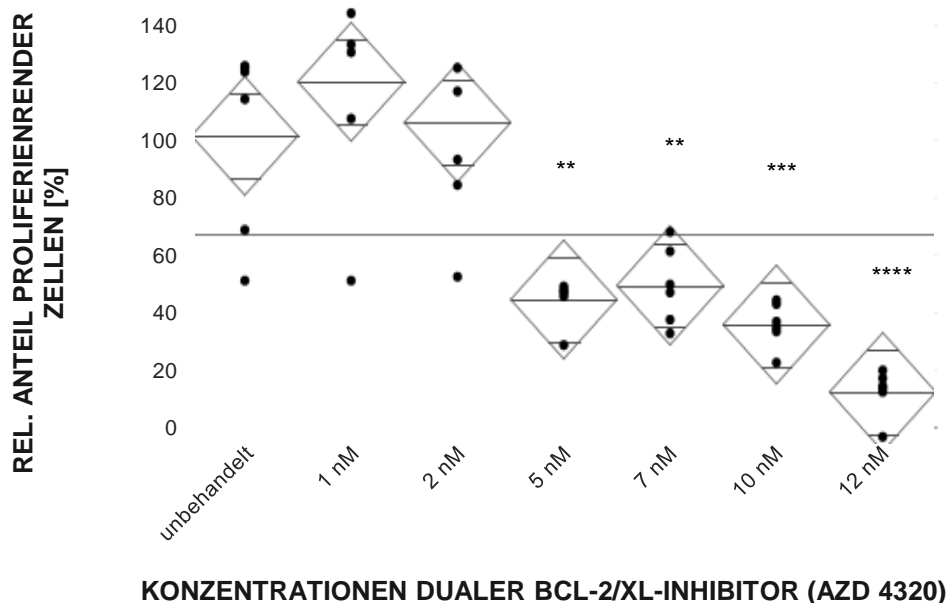
#### 3.1. Antiproliferative Wirkung der BCL-2 Inhibitoren auf AML-Zelllinien

Zunächst wurde mittels XTT-Assays getestet, ob die Inhibitoren die zelluläre Proliferation der AML-Zelllinien MOLM-13, MOLM-14, OCI AML3 und HL60 hemmen können. Nachfolgend werden die Verdünnungsreihen für die einzelnen Zelllinien dargestellt. Die Diamanten umfassen das dem Messwert zugehörige 95% Konfidenzintervall mit Mittelwert der Messwerte (n=6) als Mittellinie. Die \*-Sterne repräsentieren verschiedene Fehlerniveaus anhand definierter p-Werte (siehe Tab. 7) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und Dunnett als post-hoc-Test.

##### 3.1.1. Antiproliferative Wirkung von AZD 4320 (dualer BCL-2/XL-Inhibitor) auf AML-Zelllinien

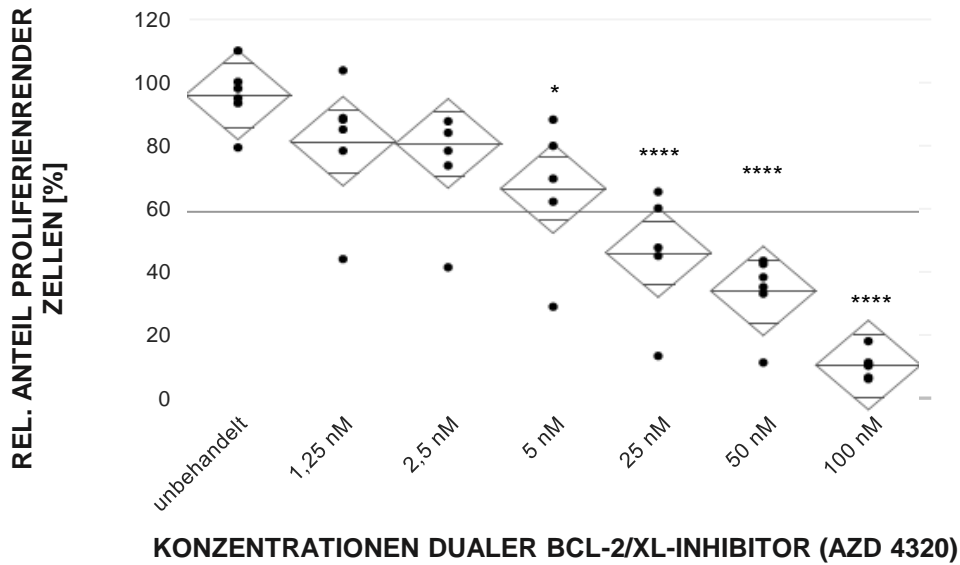
Die Zellproliferationen nahmen unter 24-stündiger Behandlung bei den vier getesteten Zelllinien ab. Es zeigten sich unter Inhibitor-Behandlung signifikante Unterschiede ( $p < 0,0001$ ) im Vergleich zur proliferativen Aktivität der Zellen in der unbehandelten Probe.

##### 3.1.1.1. MOLM-13



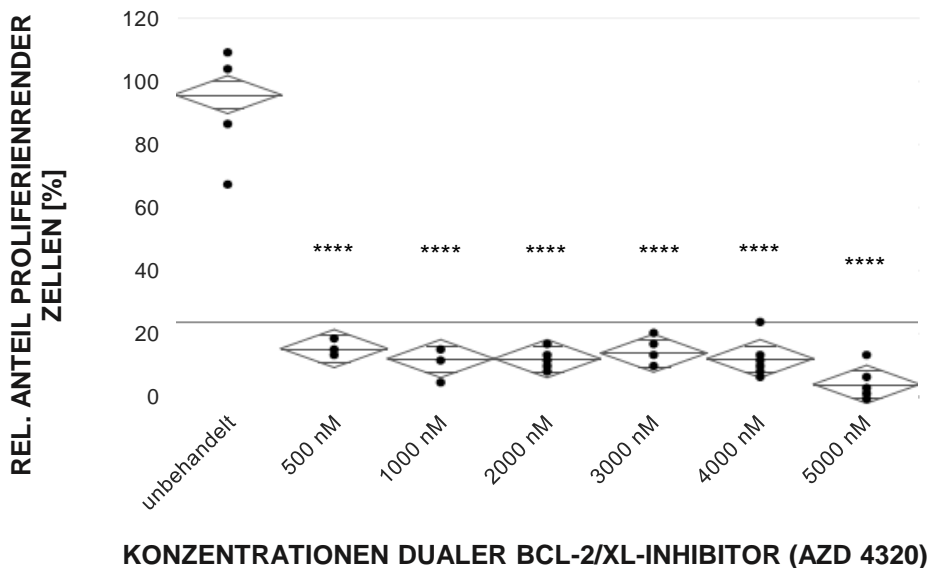
**Abb. 7:** Dosisabhängige Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4320 (dualer BCL-2/XL-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie MOLM-13 (XTT-Assay)

### 3.1.1.2. MOLM-14



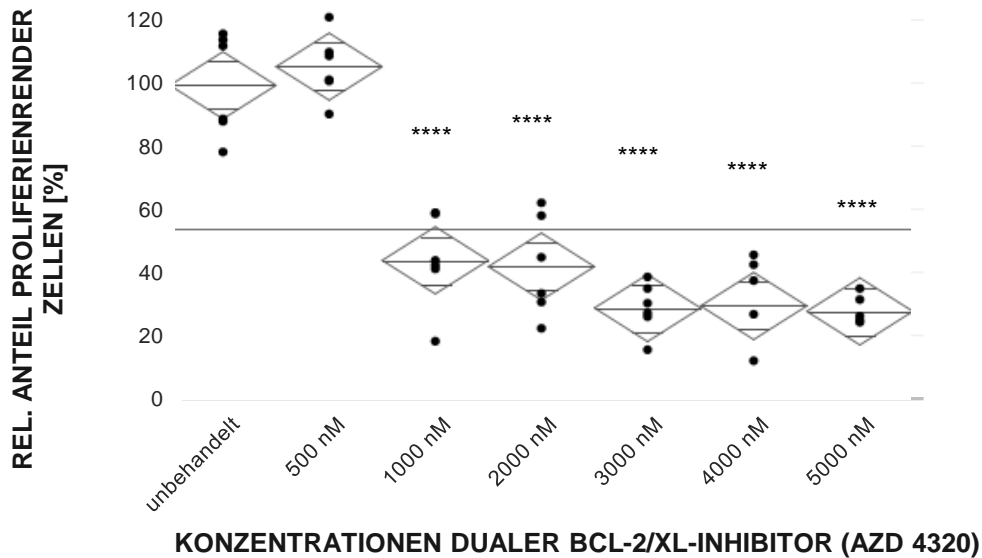
**Abb. 8:** Dosisabhängige Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4320 (dualer BCL-2/X<sub>L</sub>-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie MOLM-14 (XTT-Assay)

### 3.1.1.3. OCI AML3



**Abb. 9:** Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4320 (dualer BCL-2/X<sub>L</sub>-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie OCI AML3 (XTT-Assay)

### 3.1.1.4. HL-60

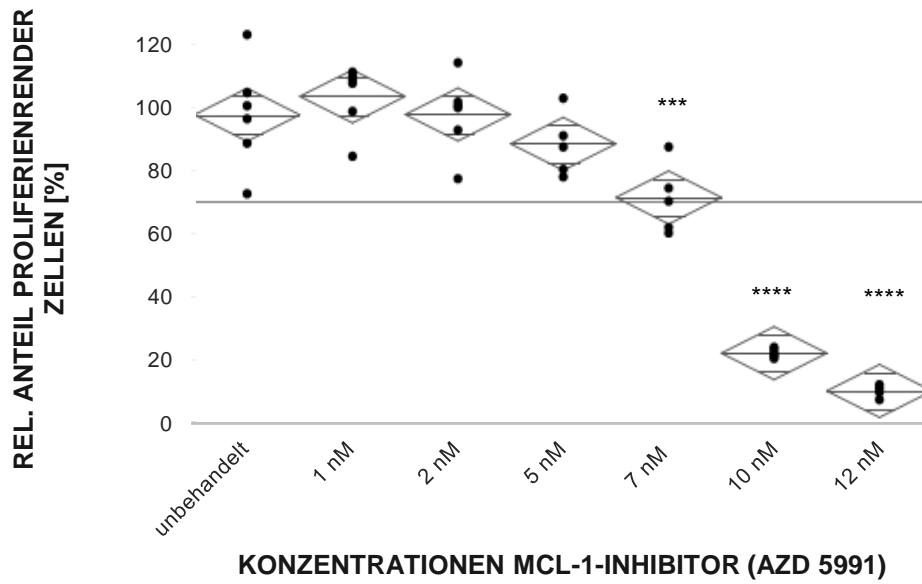


**Abb. 10:** Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4320 (dualer BCL-2/ $X_L$ -Inhibitor) bei der AML-Zelllinie HL-60 (XTT-Assay)

### 3.1.2. Antiproliferative Wirkung von AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) in AML-Zelllinien

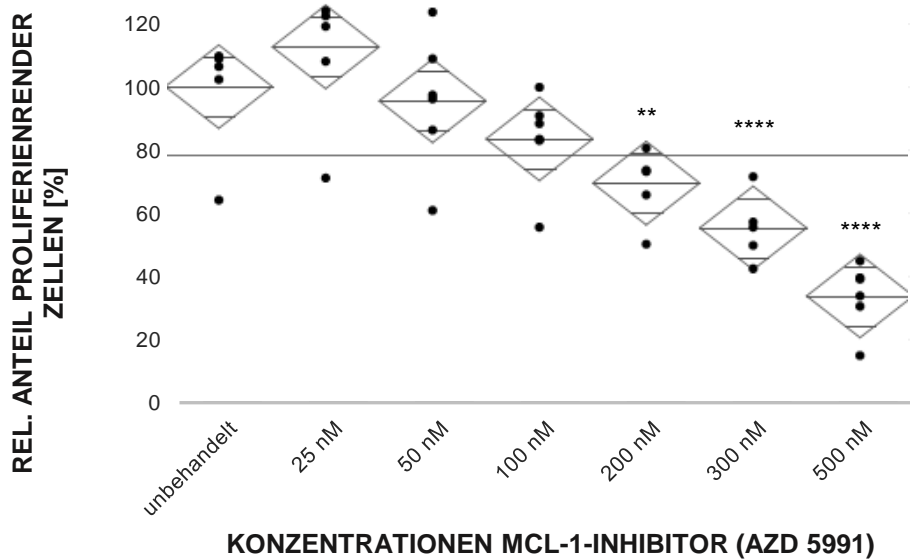
Die Zellproliferationen nahmen unter 24-stündiger Behandlung nur bei MOLM-13, MOLM-14 und OCI AML 3 ab. Es zeigten sich hierbei unter Inhibitor-Behandlung signifikante, dosisabhängige Unterschiede ( $p < 0,0001$ ) im Vergleich zur proliferativen Aktivität der Zellen in der unbehandelten Probe. Bei den HL-60-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied erzielt werden.

### 3.1.2.1. MOLM-13



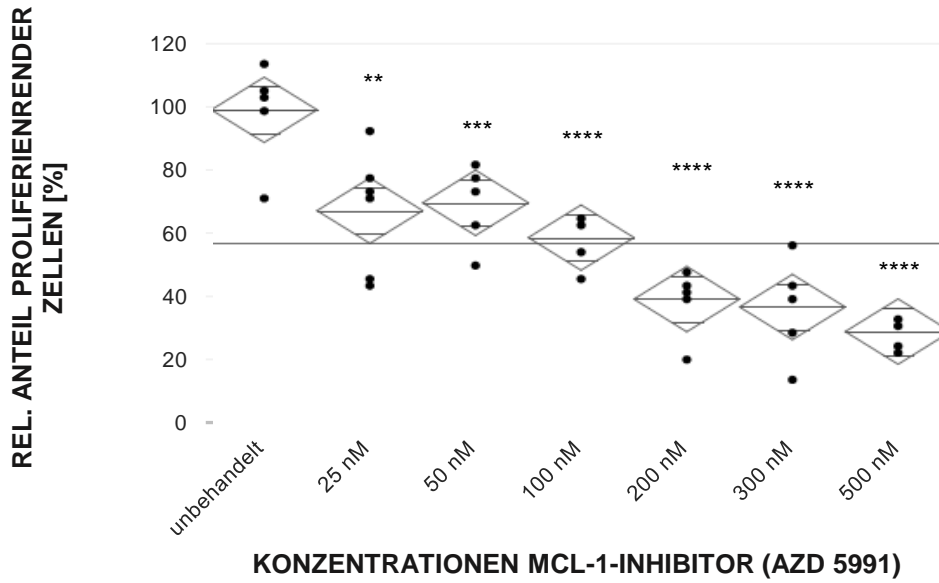
**Abb. 11:** Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie MOLM-13 (XTT-Assay)

### 3.1.2.2. MOLM-14



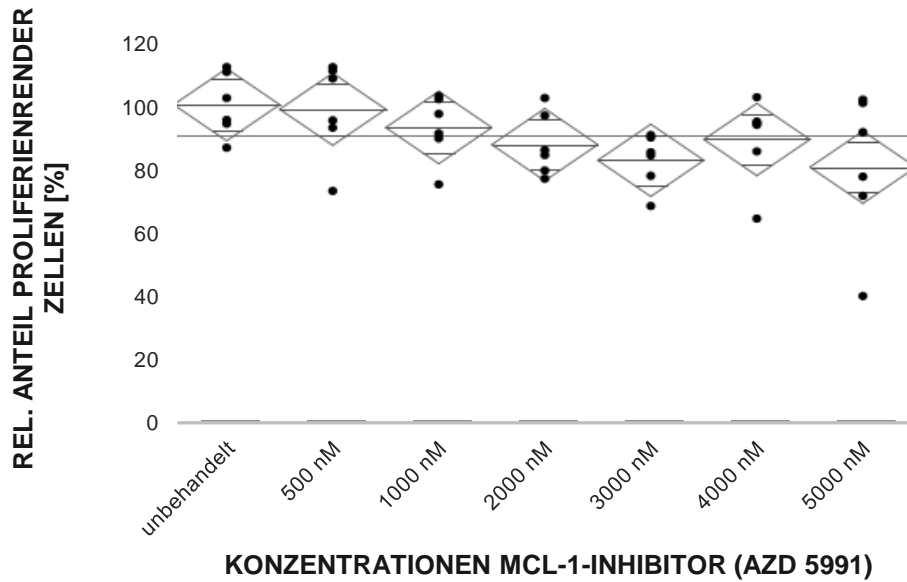
**Abb. 12:** Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie MOLM-14 (XTT-Assay)

### 3.1.2.3. OCI AML3



**Abb. 13:** Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie OCI AML3 (XTT-Assay)

### 3.1.2.4. HL-60



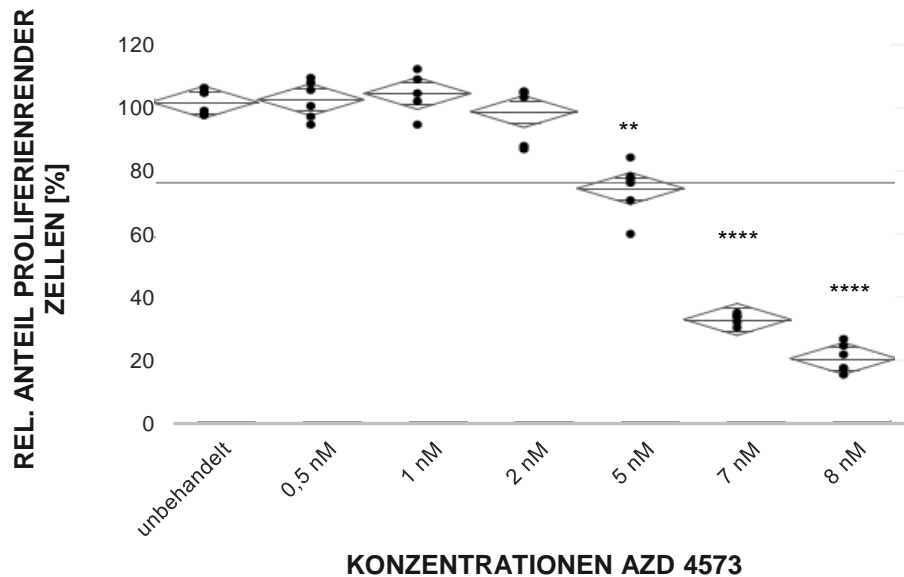
**Abb. 14:** Keine Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie MOLM-14 (XTT-Assay)



### 3.1.3. Antiproliferative Wirkung von AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) in AML-Zelllinien

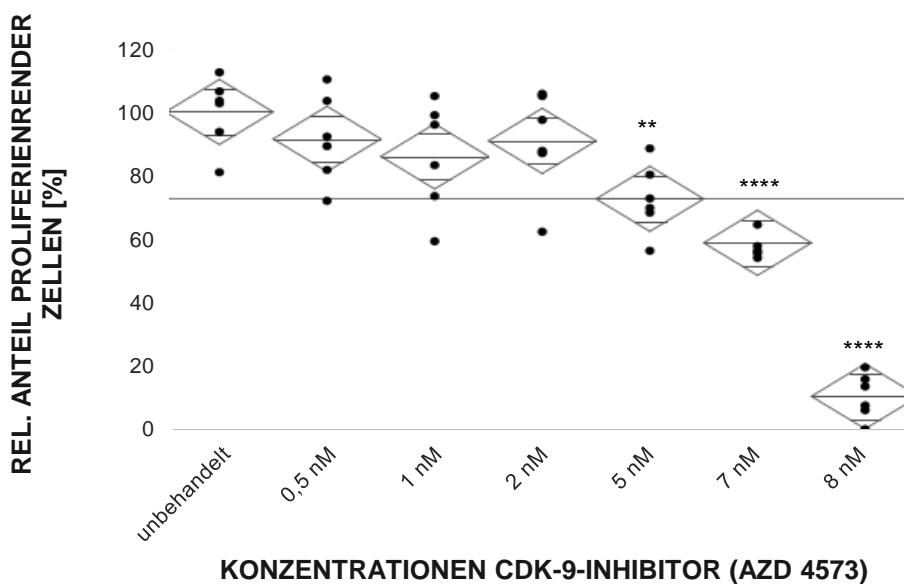
Bei allen AML-Zelllinien konnte eine signifikant zur unbehandelten Probe Reduktion der Proliferationsaktivität erzielt werden ( $p < 0,0001$ ).

#### 3.1.3.1. MOLM-13



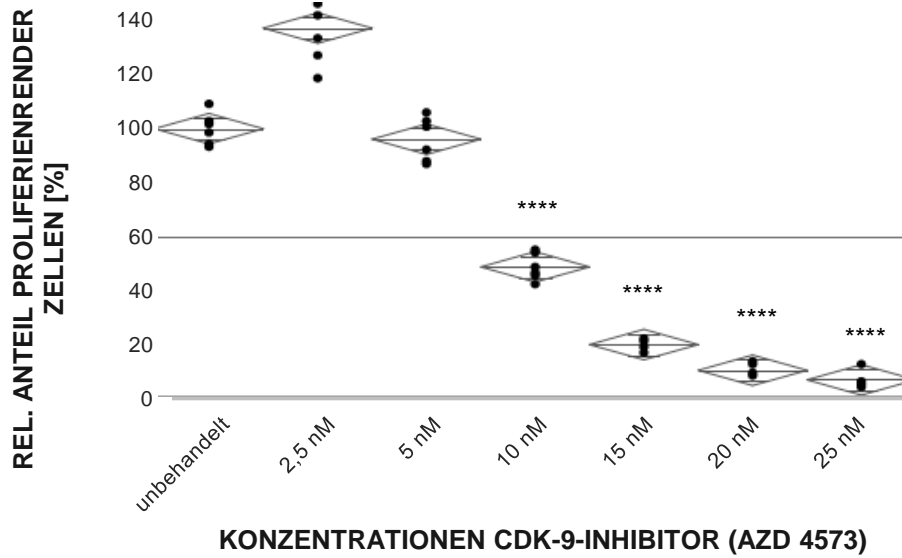
**Abb. 15:** Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie MOLM-13 (XTT-Assay)

#### 3.1.3.2. MOLM-14



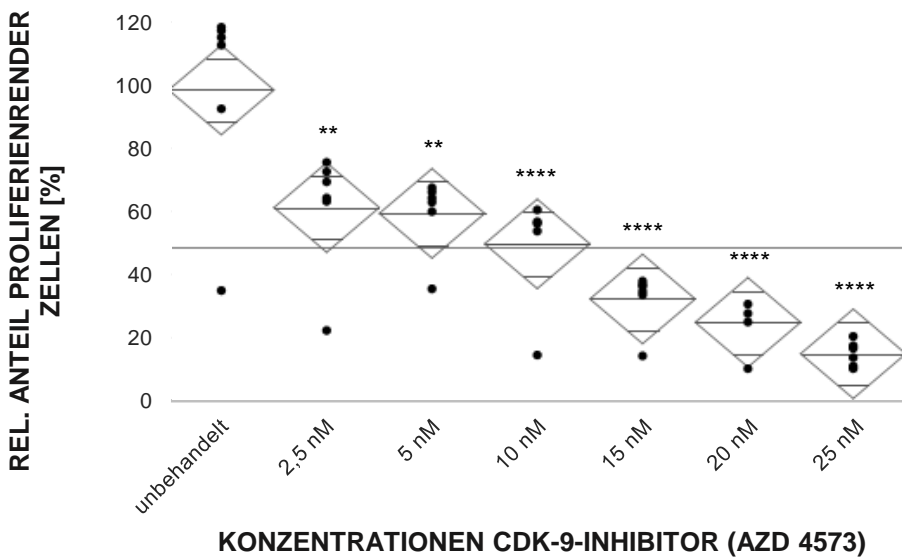
**Abb. 16:** Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie MOLM-14 (XTT-Assay)

### 3.1.3.3. OCI AML3



**Abb. 17:** Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie OCI AML3 (XTT-Assay)

### 3.1.3.4. HL-60



**Abb. 18:** Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) bei der AML-Zelllinie HL-60 (XTT-Assay)

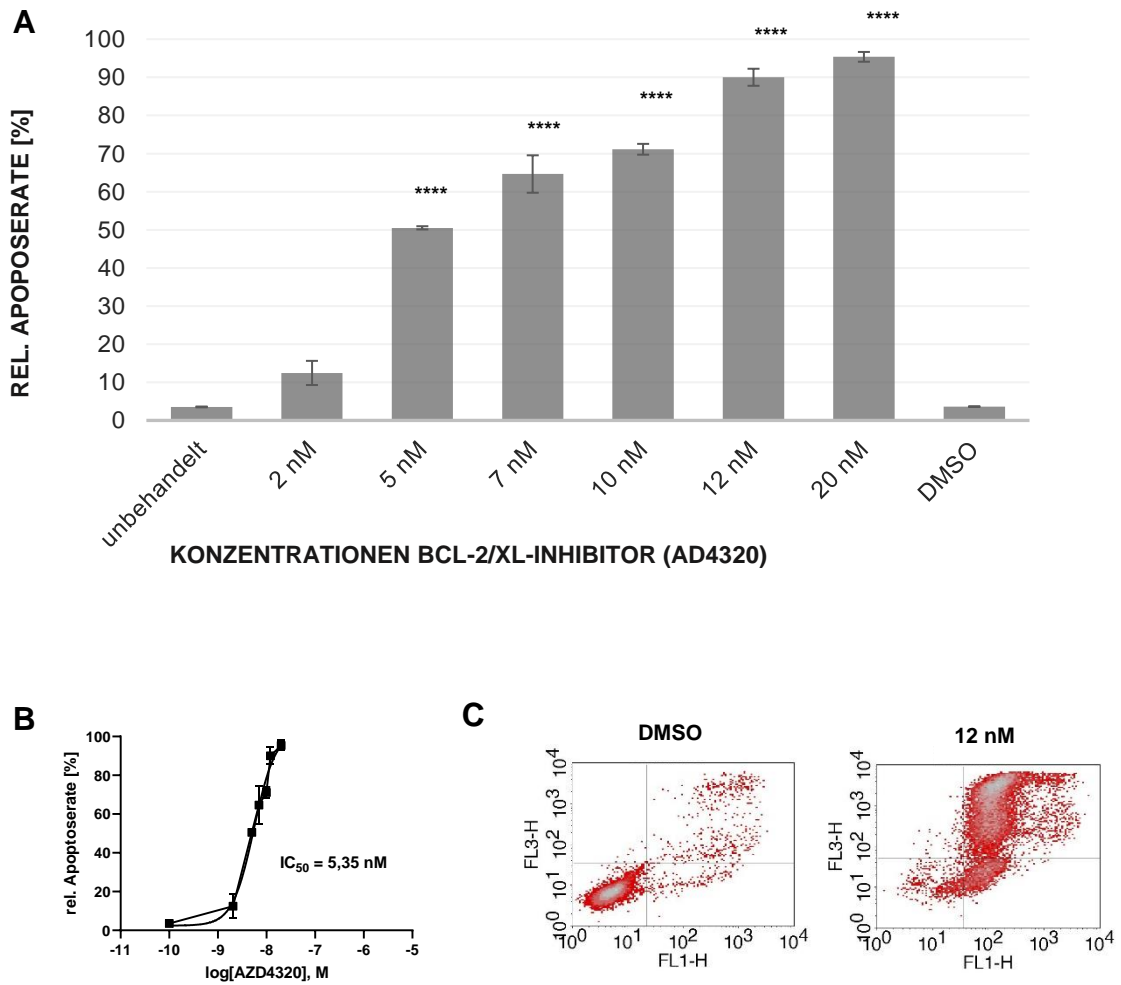
### **3.2. Apoptose-Induktion an AML-Zelllinien durch BCL-2-Inhibitoren**

Nachdem deutliche antiproliferative Effekte der Inhibitoren festgestellt werden konnten, wurde nun ausgehend davon getestet, ob die drei Inhibitoren, der duale BCL-2/XL-Inhibitor AZD 4320, der MCL-1-Inhibitor AZD 5991 und der selektive CDK-9-Inhibitor AZD 4573 Apoptose in den AML-Zelllinien MOLM-13, MOLM-14, OCI AML3 und HL-60 induzieren können. Um dies zeigen zu können, wurden Dosis-Verdünnungsreihen angelegt, um diese dann mittels Annexin-V-PI-Färbung auf den Grad apoptotischer Zellen zu messen. Aus der durchflusszytometrisch ermittelten relativen Apoptose-Rate resultiert die logarithmische Darstellung, inklusive der Berechnung des IC<sub>50</sub>-Wertes.

#### **3.2.1. Dosisabhängige Apoptose-Induktion durch AZD 4320 (dualer BCL-2/XL-Inhibitor) an AML-Zelllinien**

Der BCL-2/-XL-Inhibitor wies die höchste Konzentrationsspannweite zwischen den unterschiedlichen Zelllinien auf. In allen Zelllinien konnte eine Apoptose-Induktion erzielt werden, die sich signifikant von der Ausgangskonzentration unterschied. ( $p < 0,001$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte ( $n=3$ ) der relativen Apoptoserate. Fehlerbalken zeigen  $\pm 1$  Standard-Abweichung der gemessenen Werte an. Die \*-Sterne repräsentieren verschiedene Fehlerniveaus anhand definierter p-Werte (siehe Tab. 7). Als statistische Tests kamen ANOVA, sowie post-hoc Dunnett zum Einsatz. DMSO dient als Negativkontrolle.

### 3.2.1.1. MOLM-13

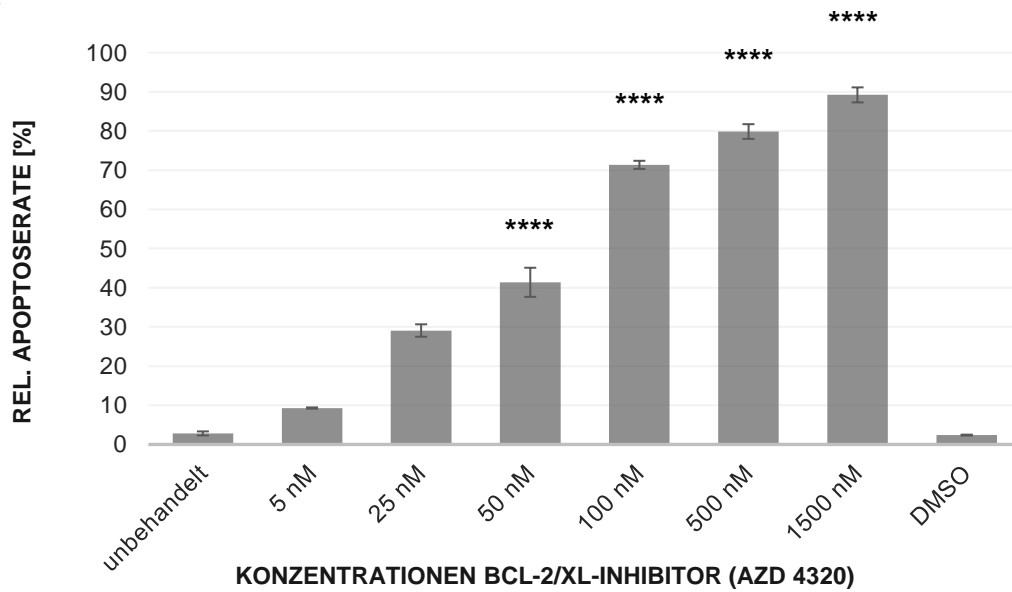


**Abb. 19:** Dosisabhängige Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der AML-Zelllinie MOLM-13 nach 48 Stunden Behandlung mit dualem BCL-2-/X<sub>L</sub>-Inhibitor (AZD 4320)

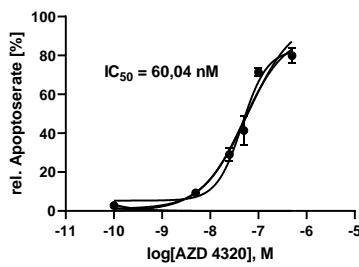
A: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptose-Rate in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration, B: logarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurve mit errechneter IC<sub>50</sub>, C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch), DMSO als Kontrolle und c[AZD 4320] = 12nm

### 3.2.1.2. MOLM-14

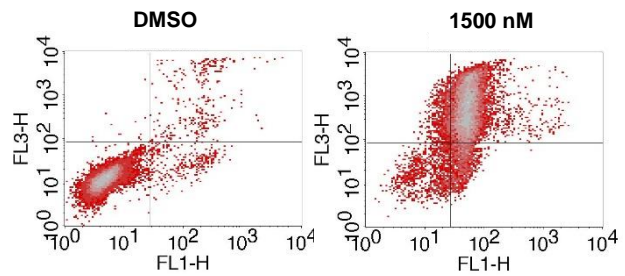
**A**



**B**



**C**

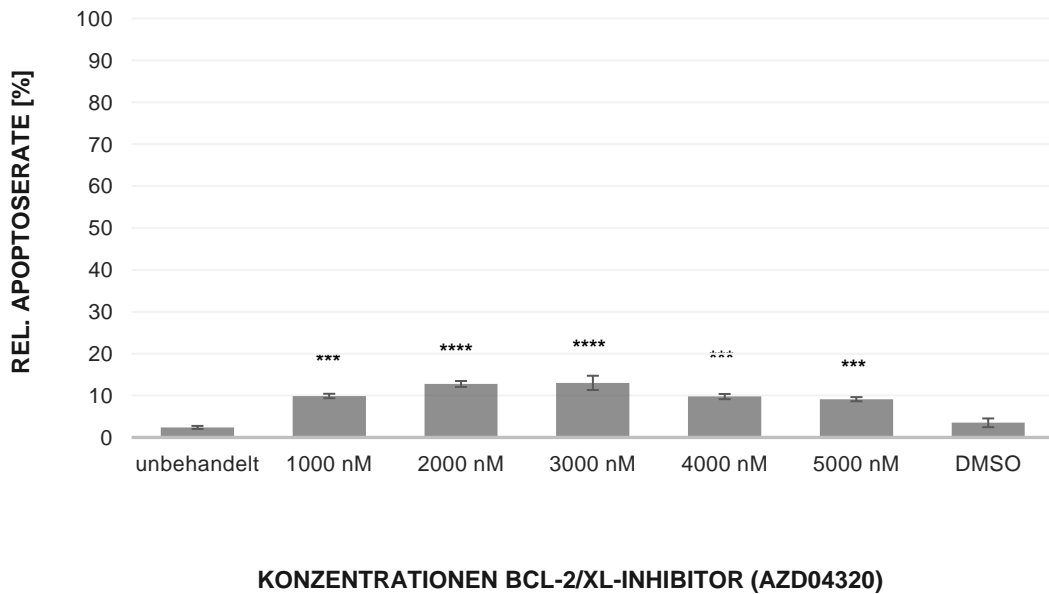


**Abb. 20: Dosisabhängige Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der AML-Zelllinie MOLM-14 nach 48 Stunden Behandlung mit dualem BCL-2-/XL-Inhibitor (AZD 4320)**

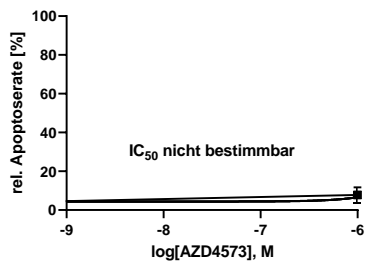
A: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptose-Rate in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration, B: logarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurve mit errechneter  $IC_{50}$ , C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch), DMSO als Kontrolle und  $c[AZD 4320] = 1500\text{nm}$

### 3.2.1.3. OCI AML3

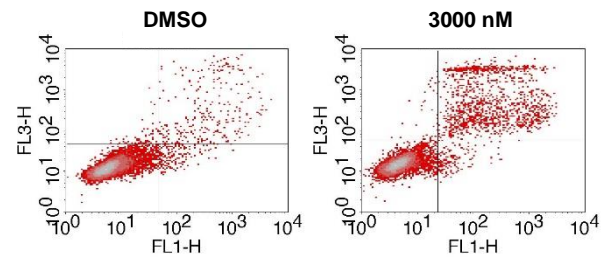
**A**



**B**



**C**

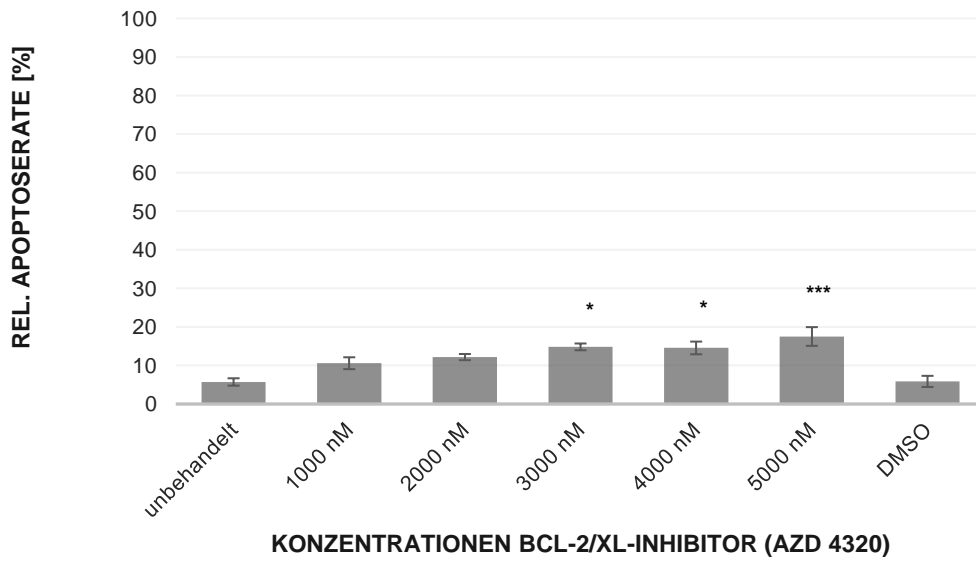


**Abb. 21:** Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der AML-Zelllinie OCI AML3 nach 48 Stunden Behandlung mit dualem BCL-2-/XL-Inhibitor (AZD 4320)

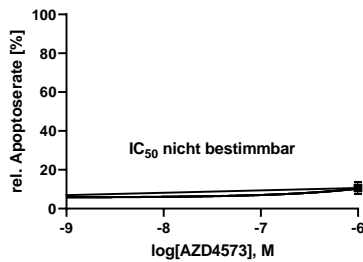
A: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptose-Rate in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration, B: logarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurve mit errechneter  $IC_{50}$ , C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch), DMSO als Kontrolle und  $c[AZD\ 4320] = 3000\text{nm}$

### 3.2.1.4. HL-60

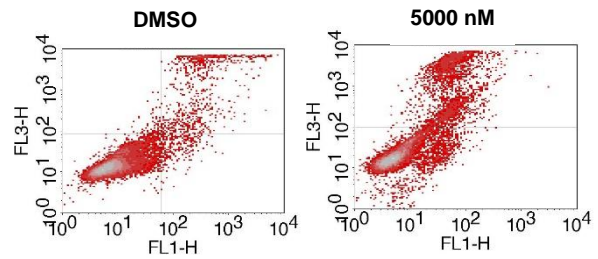
A



B



C



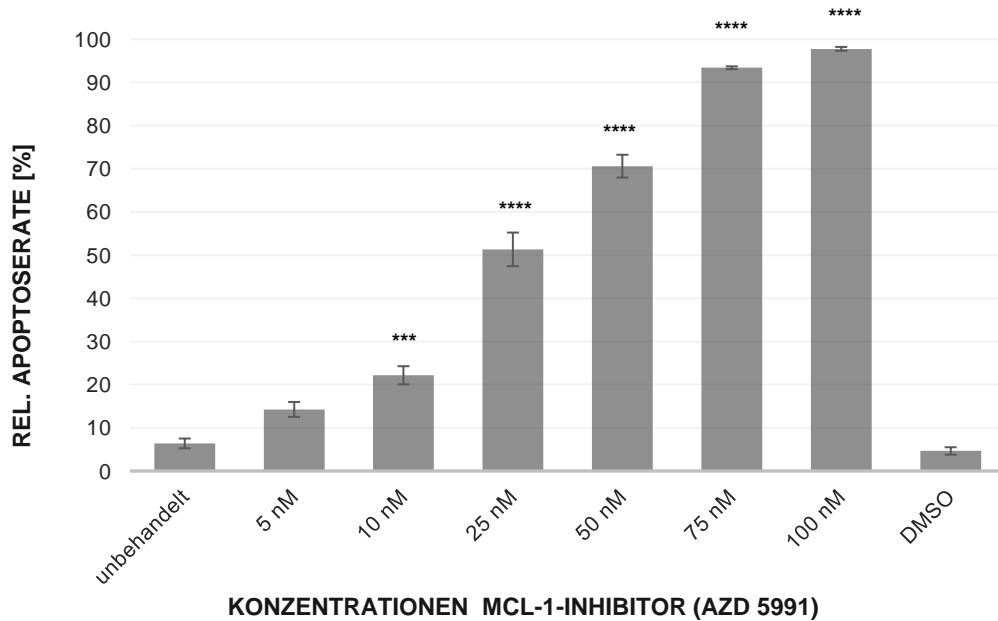
**Abb. 22:** Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der AML-Zelllinie HL-60 nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 4320

A: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptose-Rate in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration, B: logarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurve mit errechneter  $IC_{50}$ , C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch), DMSO als Kontrolle und  $c[AZD\ 4320] = 5000\text{nm}$

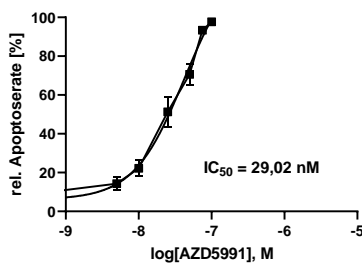
### 3.2.2. Dosisabhängige Apoptose-Induktion durch AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) an AML-Zelllinien

#### 3.2.2.1. MOLM-13

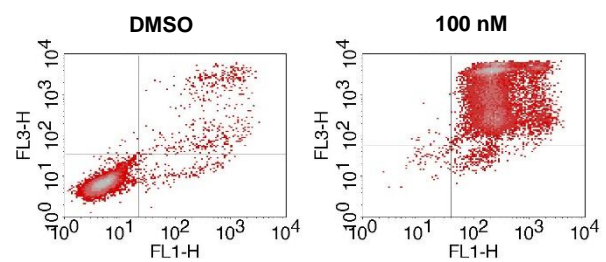
**A**



**B**



**C**

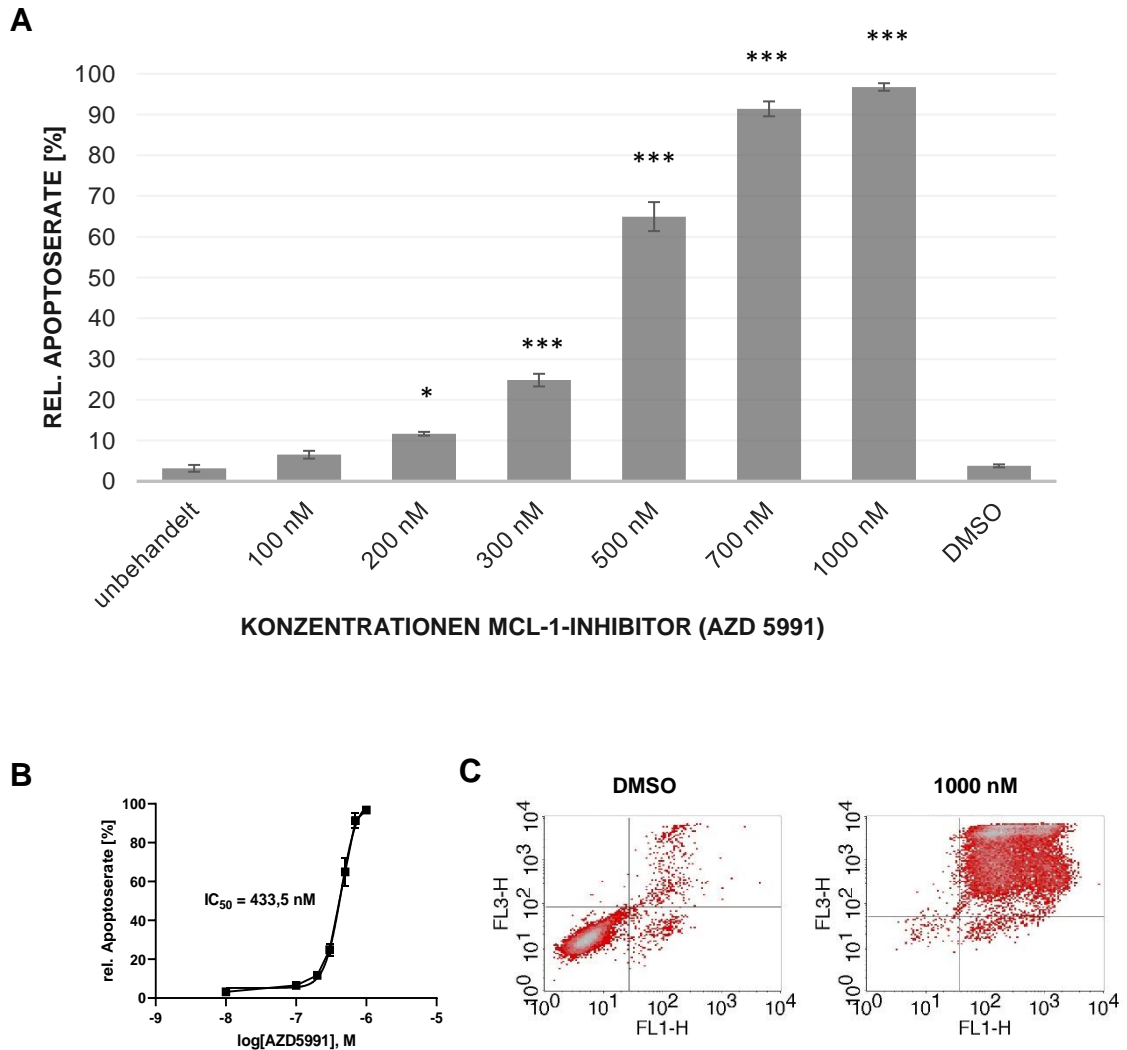


**Abb. 23: Dosisabhängige Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der AML-Zelllinie MOLM-13 nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 5991**

A: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptose-Rate in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration, B: logarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurve mit errechneter  $IC_{50}$ , C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch), DMSO als Kontrolle und  $c[AZD 5991] = 100 \text{ nm}$



### 3.2.2.2. MOLM-14

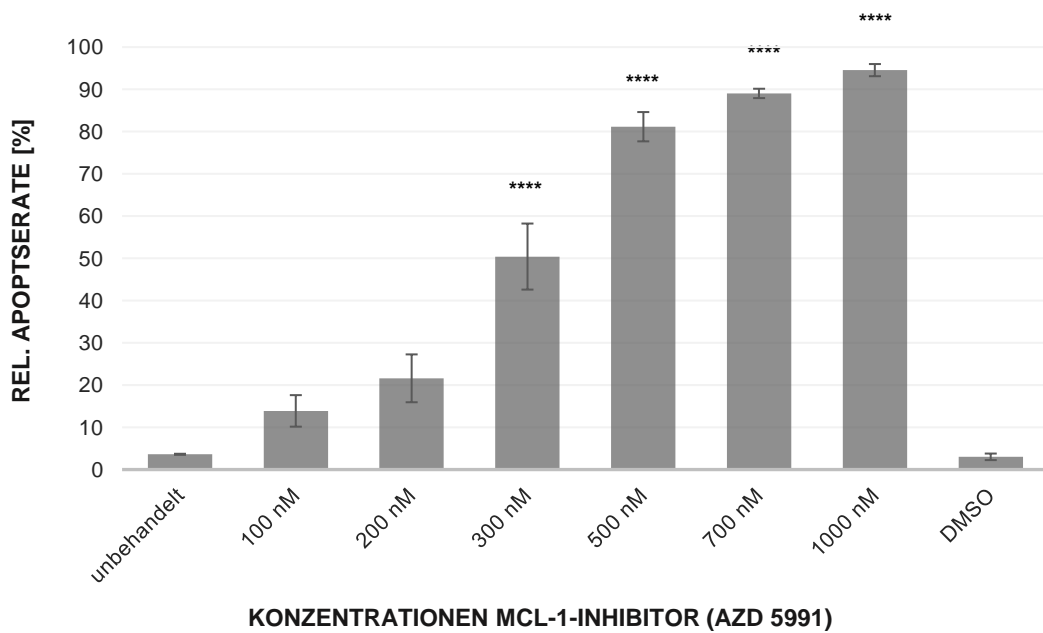


**Abb. 24: Dosisabhängige Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der AML-Zelllinie MOLM-14 nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 5991**

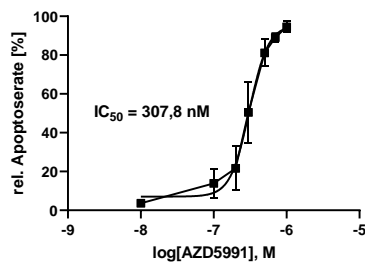
A: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptose-Rate in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration, B: logarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurve mit errechneter  $IC_{50}$ , C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch), DMSO als Kontrolle und  $c[\text{AZD 5991}] = 1000\text{nm}$

### 3.2.2.3. OCI AML3

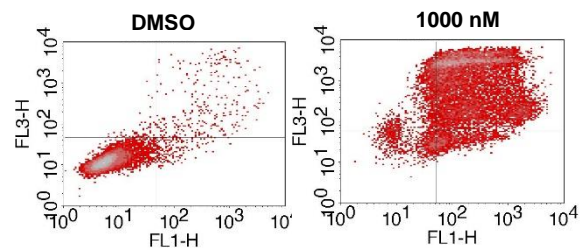
A



B



C

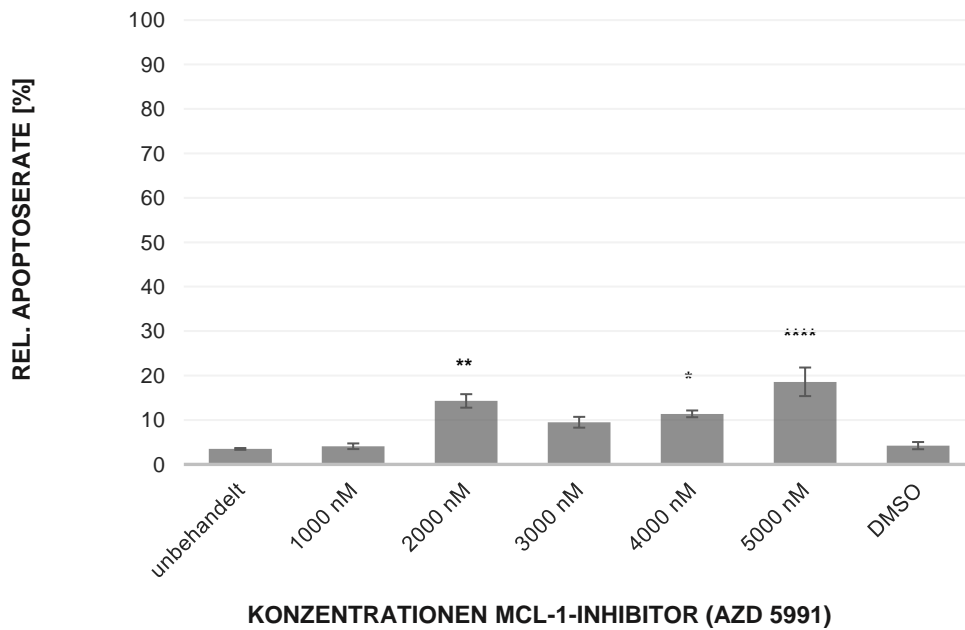


**Abb. 25: Dosisabhängige Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der AML-Zelllinie OCI AML3 nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 5991**

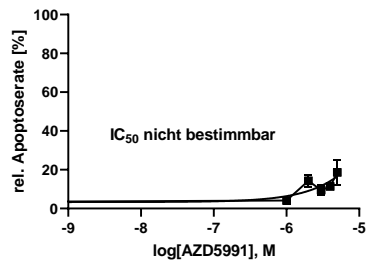
A: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptose-Rate in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration, B: logarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurve mit errechneter  $IC_{50}$ , C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch), DMSO als Kontrolle und  $c[AZD 5991] = 1000\text{nm}$

### 3.2.2.4. HL-60

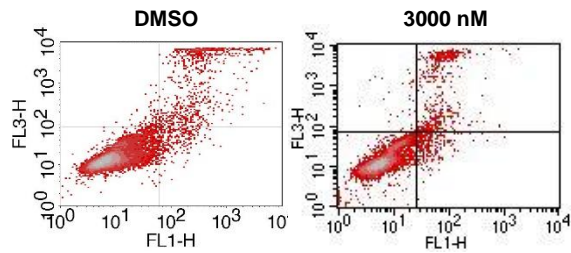
A



B



C



**Abb. 26: Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der AML-Zelllinie HL-60 nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 5991**

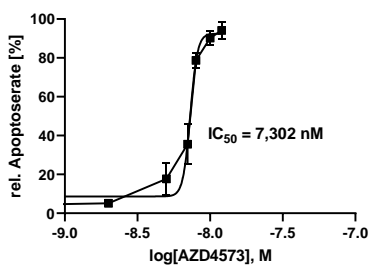
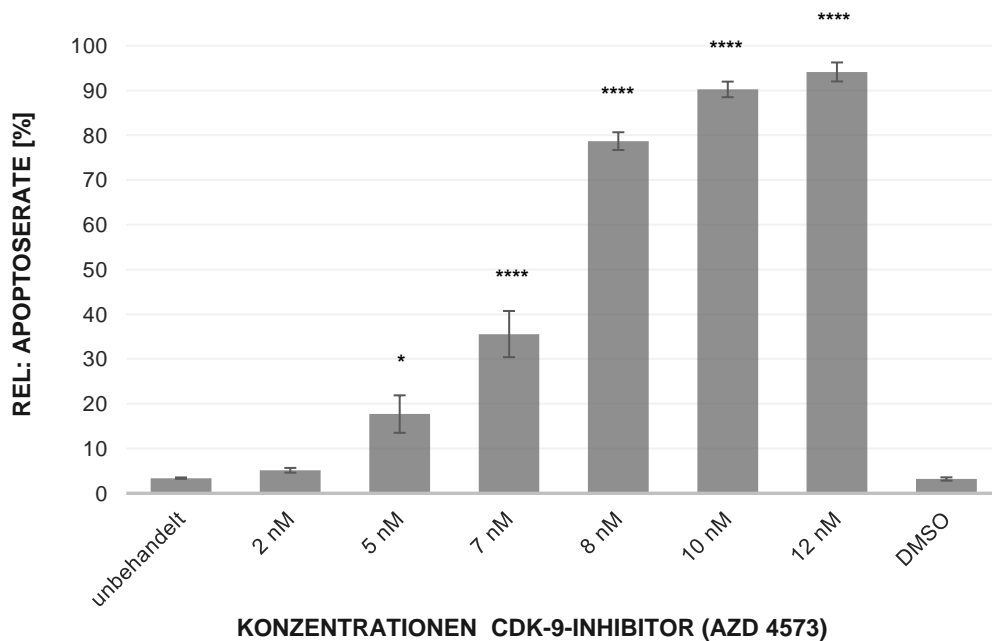
A: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptose-Rate in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration, B: logarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurve mit errechneter  $IC_{50}$ , C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch), DMSO als Kontrolle und  $c[AZD 5991] = 3000\text{nm}$

### 3.2.3. Dosisabhängige Apoptose-Induktion durch AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) an AML-Zelllinien

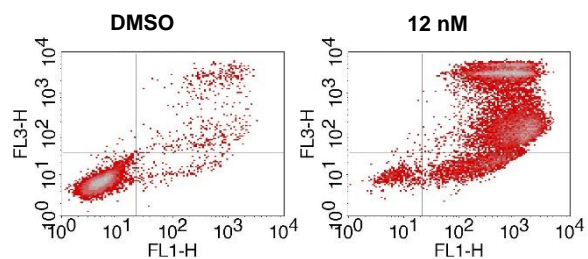
Unter Behandlung mittels CDK-9-Inhibitor konnte bei allen vier Zelllinien eine dosisabhängige Apoptose-Induktion >90% erzielt werden, die sich signifikant von der unbehandelten Ausgangsprobe unterschied ( $p < 0,0001$ ).

#### 3.2.3.1. MOLM-13

**A**



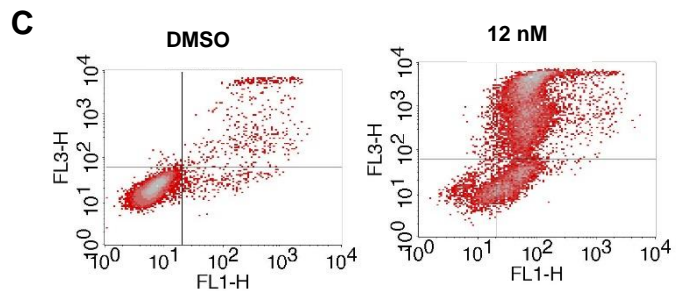
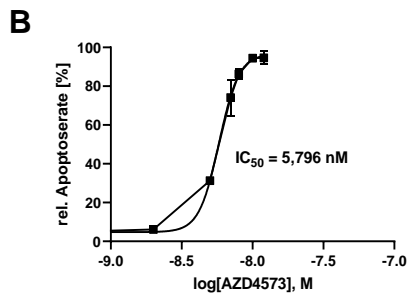
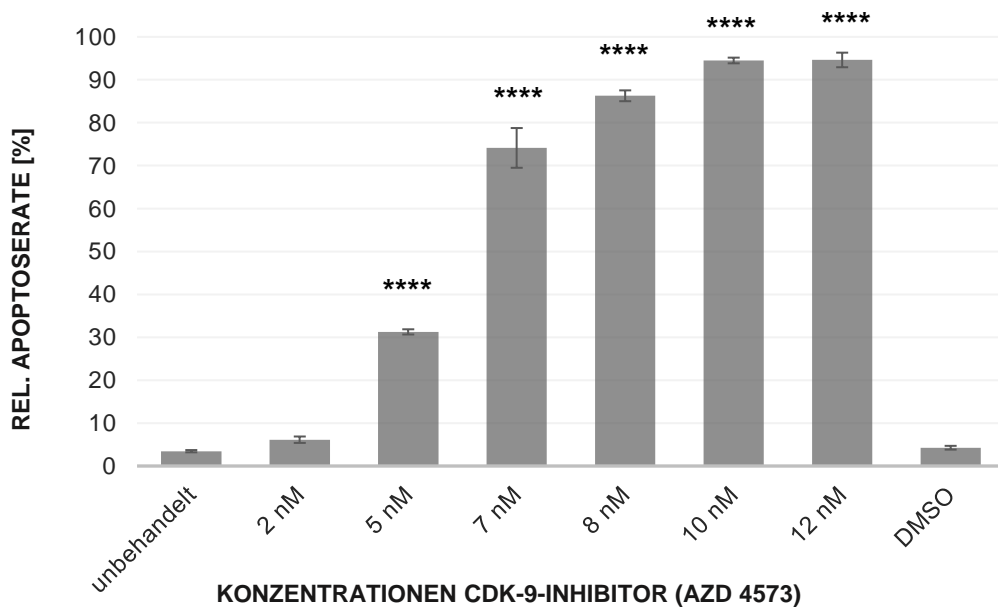
**C**



**Abb. 27:** Dosisabhängige Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der AML-Zelllinie MOLM-13 nach 48 Stunden Behandlung mit selektivem CDK-9-Inhibitor (AZD 4573)

A: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptose-Rate in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration, B: logarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurve mit errechneter  $IC_{50}$ , C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch), DMSO als Kontrolle und  $c[AZD 4573] = 12 \text{ nm}$

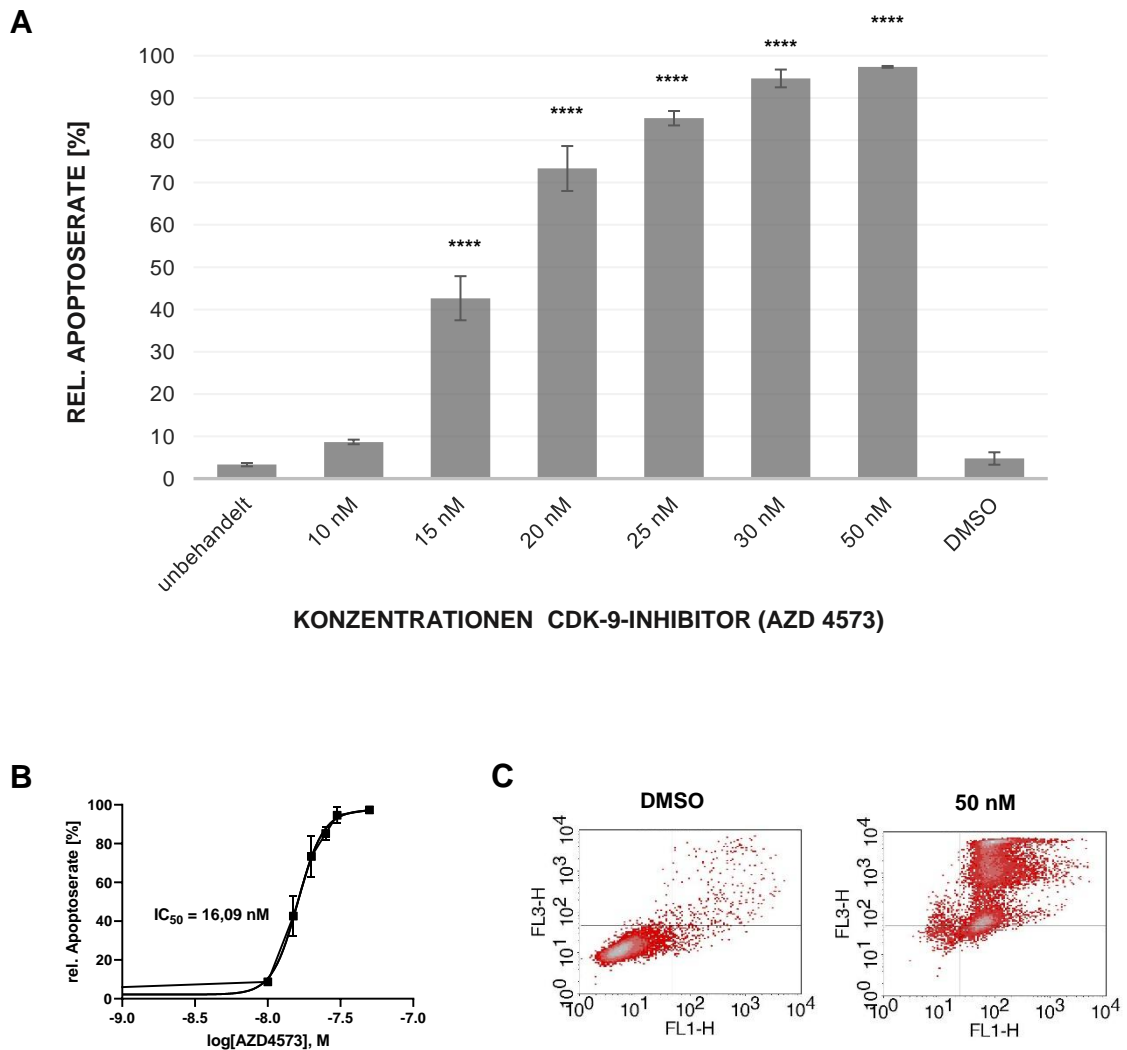
### 3.2.3.2. MOLM-14



**Abb. 28: Dosisabhängige Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der AML-Zelllinie MOLM-14 nach 48 Stunden Behandlung mit selektivem CDK-9-Inhibitor (AZD 4573)**

A: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptose-Rate in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration, B: logarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurve mit errechneter  $IC_{50}$ , C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch), DMSO als Kontrolle und  $c[AZD\ 4573] = 12\text{nm}$

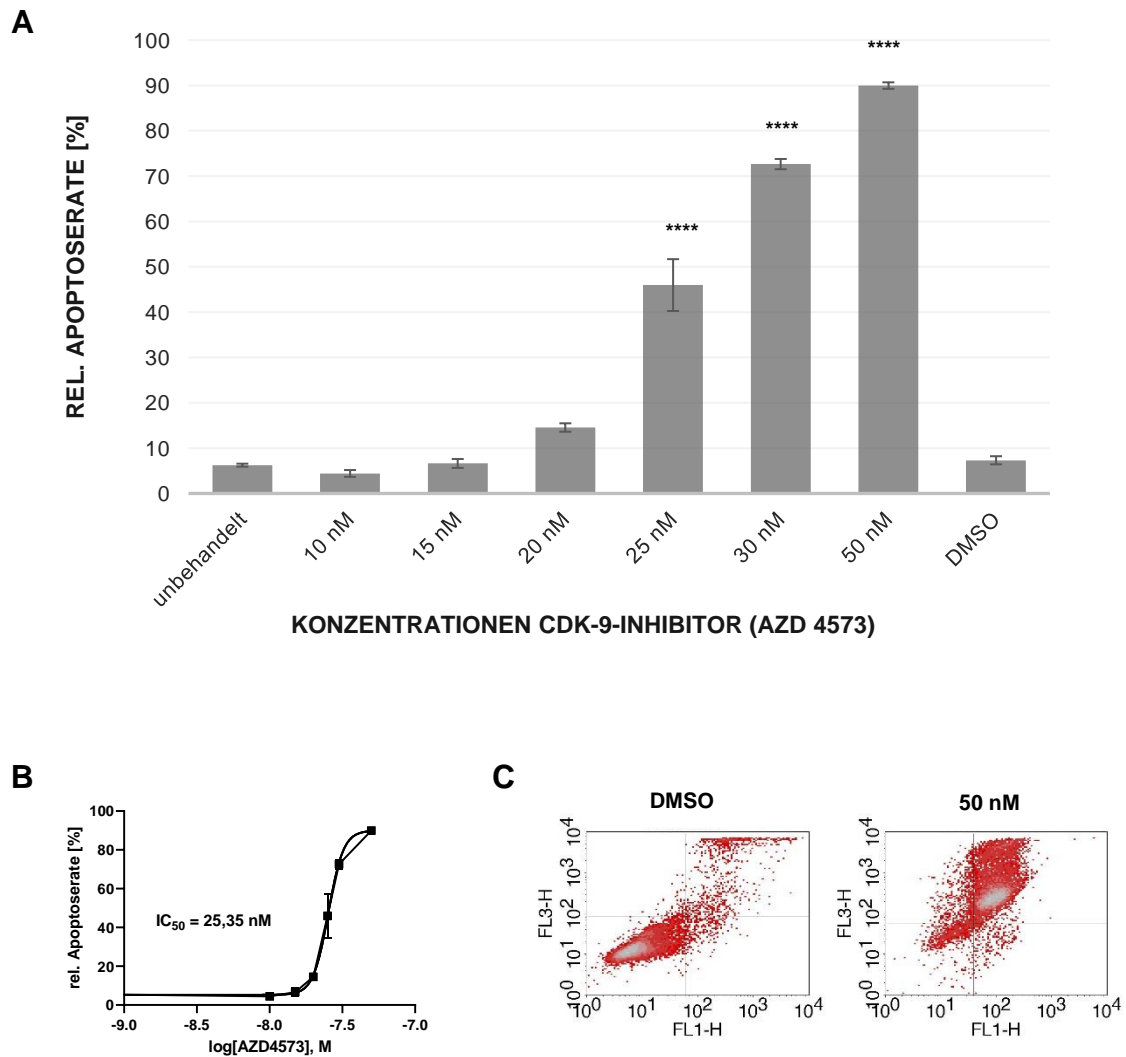
### 3.2.3.3. OCI AML3



**Abb. 29:** Dosisabhängige Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der AML-Zelllinie OCI AML3 nach 48 Stunden Behandlung mit selektivem CDK-9-Inhibitor (AZD 4573)

A: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptose-Rate in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration, B: logarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurve mit errechneter  $IC_{50}$ , C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch), DMSO als Kontrolle und  $c[AZD 4573] = 50 \text{ nM}$

### 3.2.3.4. HL-60



**Abb. 30:** Dosisabhängige Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der AML-Zelllinie HL-60 nach 48 Stunden Behandlung mit selektivem CDK-9-Inhibitor (AZD 4573)

A: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptose-Rate in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration, B: logarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurve mit errechneter  $IC_{50}$ , C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch), DMSO als Kontrolle und  $c[\text{AZD } 4573] = 50 \text{ nm}$

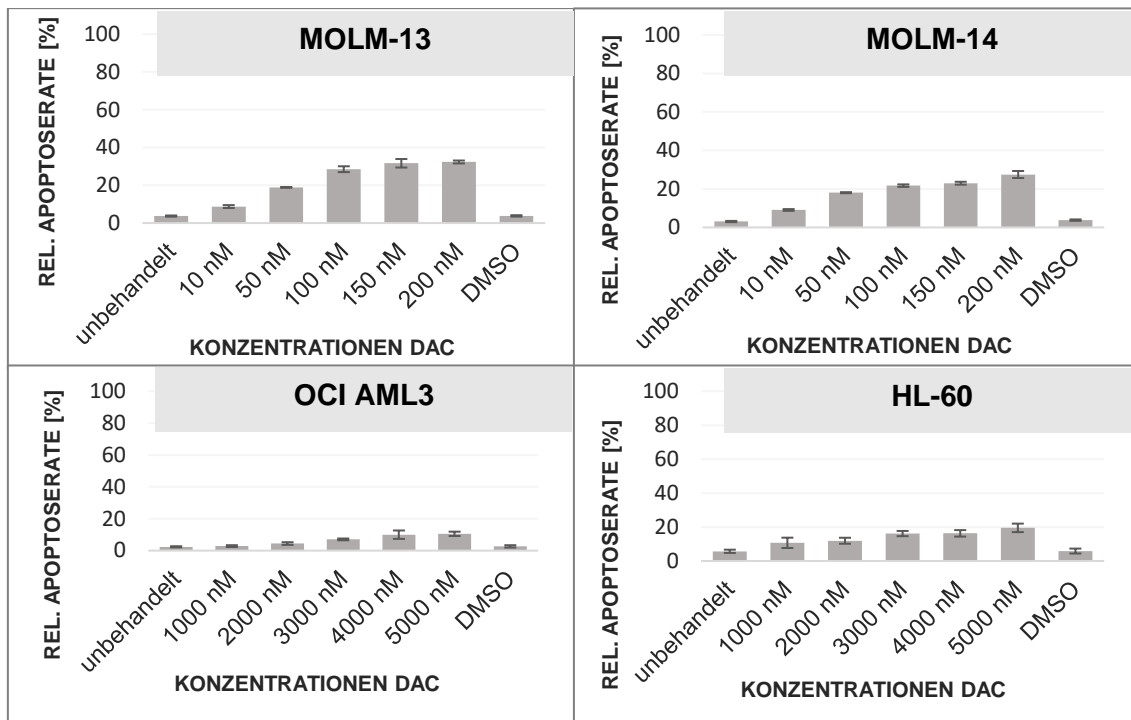
### **3.3. Apoptose-Induktion an AML-Zelllinien durch Kombination von BCL-2-Inhibitoren mit Decitabin (DAC)**

Auf der Grundlage des Arzneimittelsynergismus zwischen Venetoclax und hypomethylierenden Substanzen wurden in den nächsten Versuchen die Inhibitoren, der duale BCL-2/X<sub>L</sub>-Inhibitor (AZD 4320), der MCL-1-Inhibitor (AZD 5991), sowie der selektive CDK-9-Inhibitor (AZD 4573) mit DAC kombiniert und mittels Isobologrammanalyse auf mögliche synergistische Effekte bei der Apoptose-Induktion untersucht. Als Methode wurden Annexin-PI-Assays verwendet. Für eine optimale Vergleichbarkeit wurden für die Kombinationsbehandlungen die gleichen Dosen, wie für die Einzelsubstanztestungen gewählt.

#### **3.3.1. Ermittlung geeigneter DAC-Konzentrationen für die Kombinationsbehandlung**

Zur Ermittlung geeigneter DAC-Konzentration für die Kombinationsbehandlung mit den Inhibitoren wurden die Leukämie-Zelllinien mit DAC als Einzelsubstanz ohne Inhibitoren behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=3) der relativen Apoptoserate. Fehlerbalken zeigen  $\pm 1$  Standard-Abweichung der gemessenen Werte. DMSO dient als Negativkontrolle. Es wurden DAC-Konzentrationen gewählt, die gering-apoptotische Effekte aufweisen (ca. 20% Apoptoserate). Für die sensitiveren MOLM-13 und MOLM-14 wurden 100nm DAC, für OCI AML3 und HL-60 1000 nM = 1  $\mu$ M DAC festgesetzt.





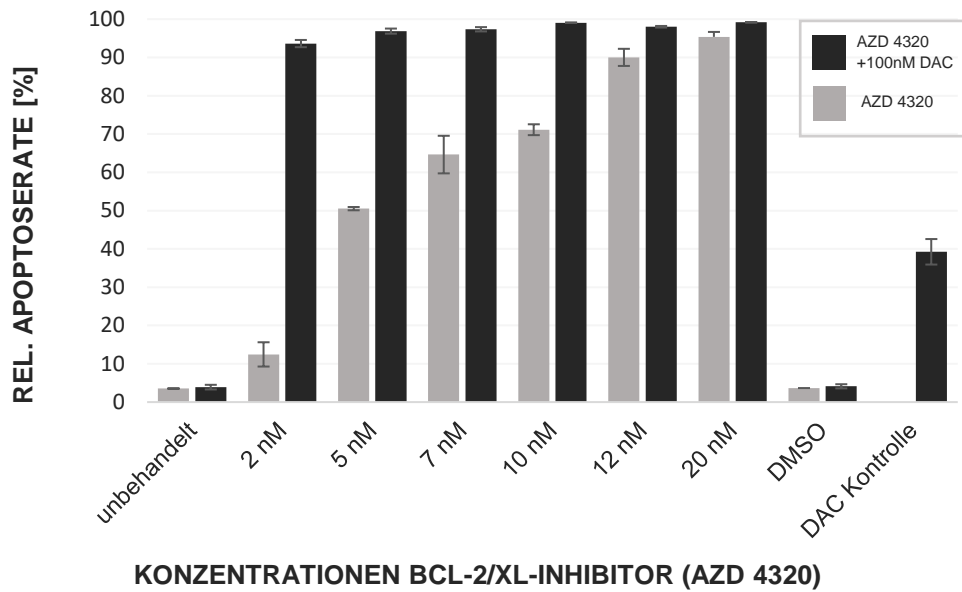
**Abb. 31:** Dosisabhängige Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei den Leukämie-Zelllinien MOLM-13, MOLM-14, OCI AML 3 und HL-60 nach 48 Stunden Behandlung mit DAC

### 3.3.2. Apoptose-Induktion an AML-Zelllinien durch Kombination von AZD 4320 (BCL-2/-XL-Inhibitor) mit Decitabin (DAC) an AML-Zelllinien

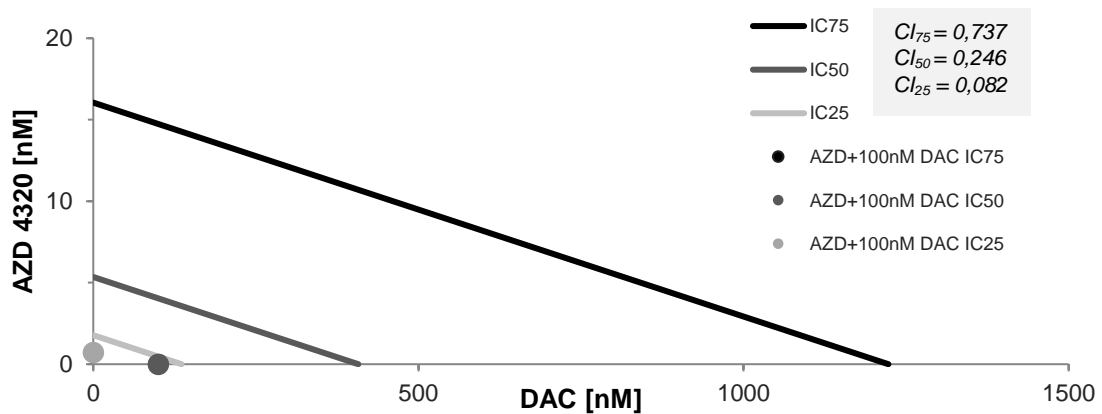
In der Kombination des BCL-2/-XL-Inhibitors mit DAC zeigten sich bei allen getesteten AML-Zelllinien stark synergistische Effekte (\*\* $p < 0,0001$ ).

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen ( $n=3$ ) der relativen, prozentualen Apoptoserate. Fehlerbalken zeigen  $\pm 1$  Standard-Abweichung der gemessenen Werte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse.

### 3.3.2.1. MOLM-13

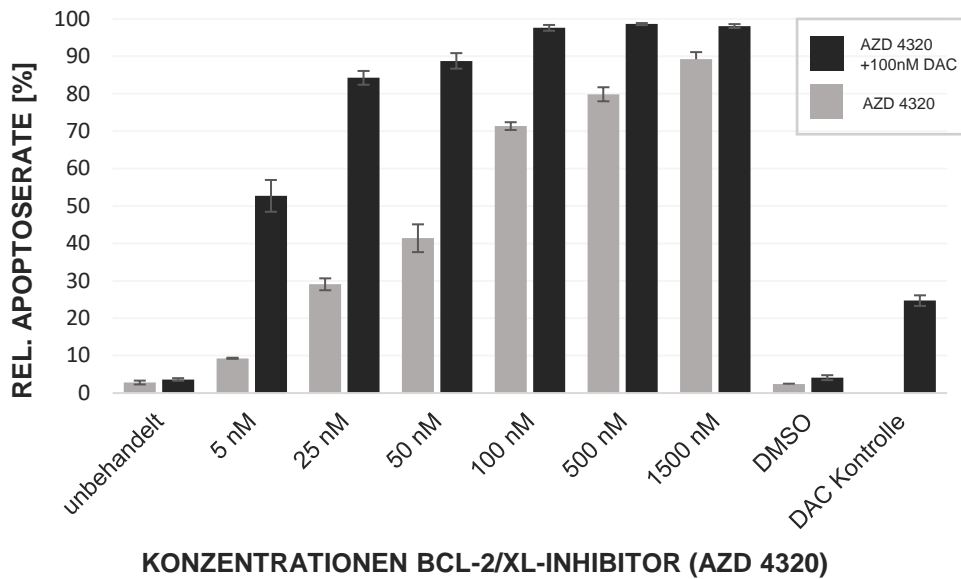


**Abb. 32:** Vergleich der Apoptoserate (Annexin-PI-Assay) der AML-Zelllinie MOLM-13 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4320 -DAC (hellgrau) und AZD 4320 + 100nM DAC (dunkelgrau): Der mittlere Unterschied zwischen den Reihen beträgt 28,62%. Der Interaktionsfaktor ist 13,57 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) und der Säulenfaktor 15,77 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

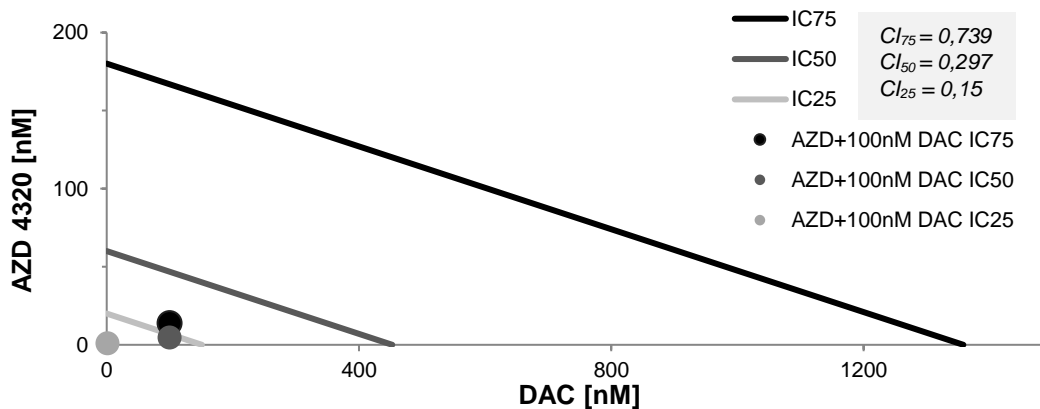


**Abb. 33:** Isobologramm Kombinationsbehandlung AZD 4320 + DAC an MOLM-13-Zellen

### 3.3.2.2. MOLM-14

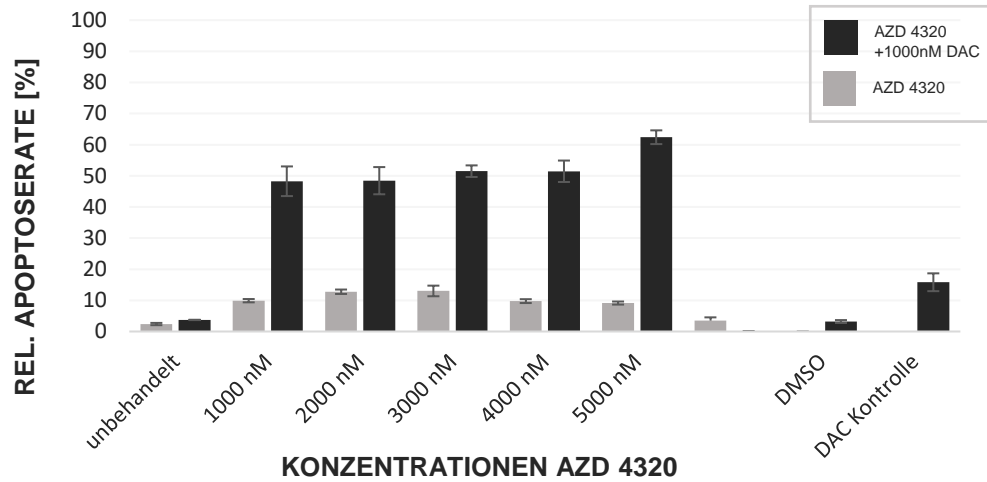


**Abb. 34:** Vergleich der Apoptoserate (Annexin-PI-Assay) der AML- Zelllinie MOLM-14 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4320 -DAC (hellgrau) und AZD 4320 + 100nM DAC (dunkelgrau): Der mittlere Unterschied zwischen den Reihen beträgt 26,68%. Der Interaktionsfaktor ist 7,196 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) und der Säulenfaktor 16,29 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).



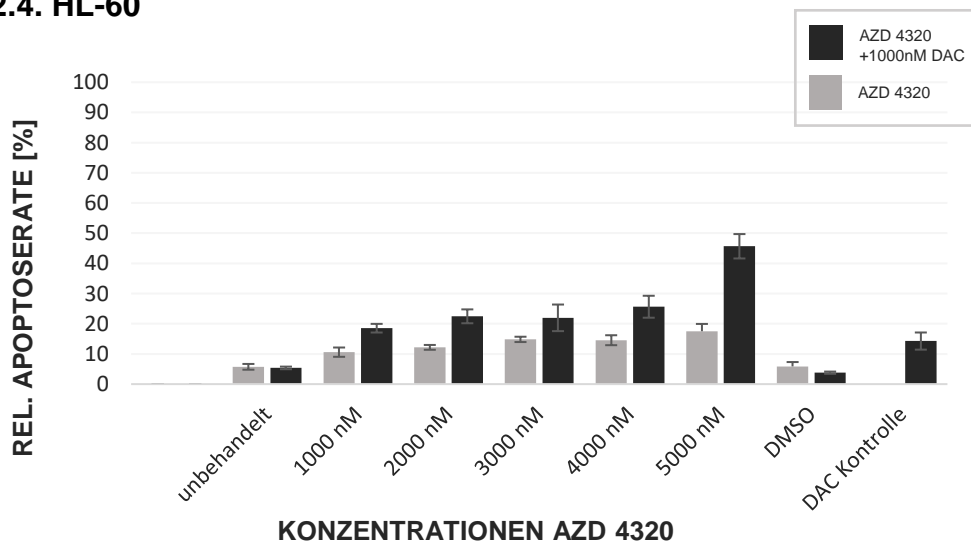
**Abb. 35:** Isobologramm Kombinationsbehandlung AZD 4320 + DAC an MOLM-14-Zellen

### 3.3.2.3. OCI AML3



**Abb. 36:** Vergleich der Apoptoserate (Annexin-PI-Assay) der AML- Zelllinie OCI AML3 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4320 -DAC (hellgrau) und AZD 4320 + 1000nM DAC (dunkelgrau): Der mittlere Unterschied zwischen den Reihen beträgt 34,8%. Der Interaktionsfaktor ist 12,81 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) und der Säulenfaktor 60,61 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

### 3.3.2.4. HL-60

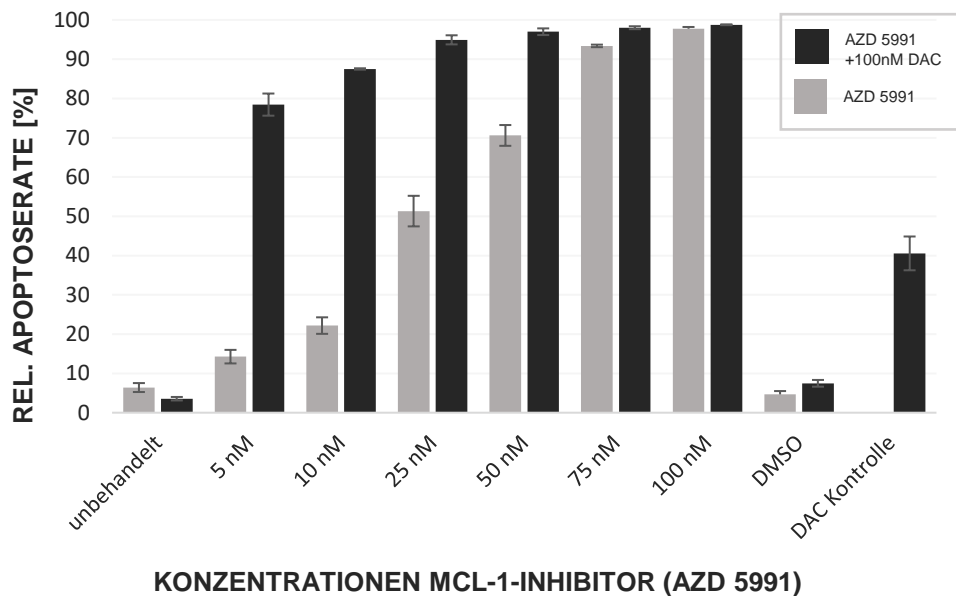


**Abb. 37:** Vergleich der Apoptoserate (Annexin-PI-Assay) der AML- Zelllinie HL-60 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4320 -DAC (hellgrau) und AZD 4320 + 1000nM DAC (dunkelgrau): Der mittlere Unterschied zwischen den Reihen beträgt 10,71%. Der Interaktionsfaktor ist 15,25 (\*\*  $p = 0,0012$ ) und der Säulenfaktor 23,45 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

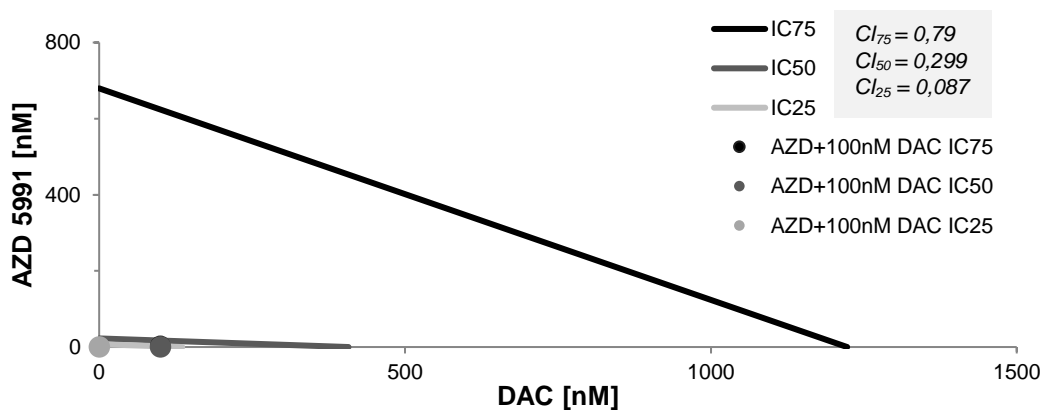
### 3.3.3. Apoptose-Induktion an AML-Zelllinien durch Kombination von AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) mit Decitabin (DAC)

In der Kombination des MCL-1-Inhibitors mit DAC zeigten sich bei allen getesteten AML-Zelllinien stark synergistische Effekte.

#### 3.3.3.1. MOLM-13

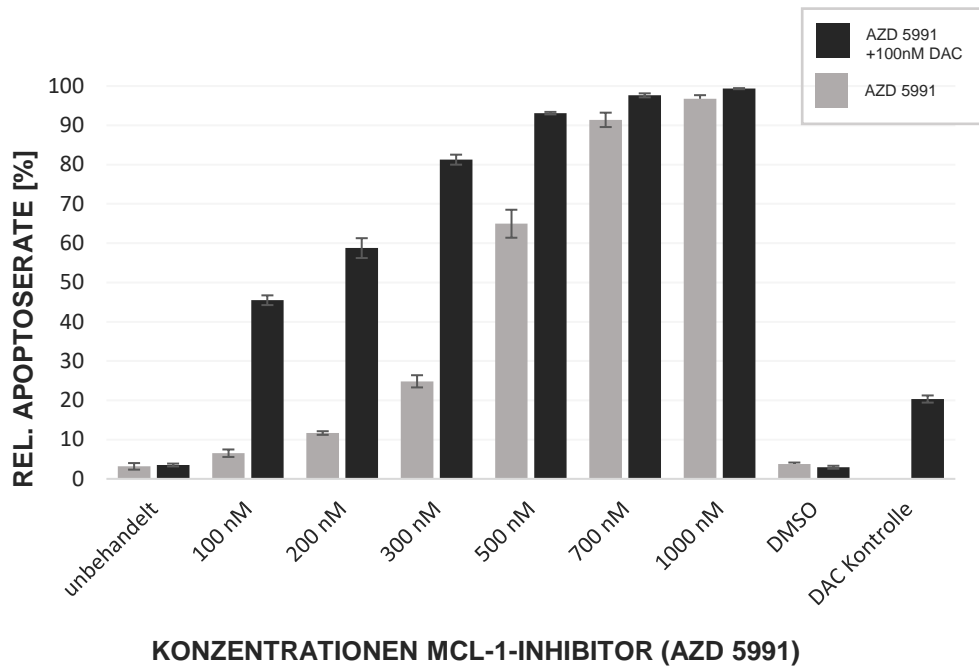


**Abb. 38:** Vergleich der Apoptoserate (Annexin-PI-Assay) der AML- Zelllinie MOLM-13 nach 48 Stunden Behandlung AZD 5991 -DAC (hellgrau) und AZD 5991 + 100nM DAC (dunkelgrau): Der mittlere Unterschied zwischen den Reihen beträgt 28,9%. Der Interaktionsfaktor ist 13,85 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) und der Säulenfaktor 15,67 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

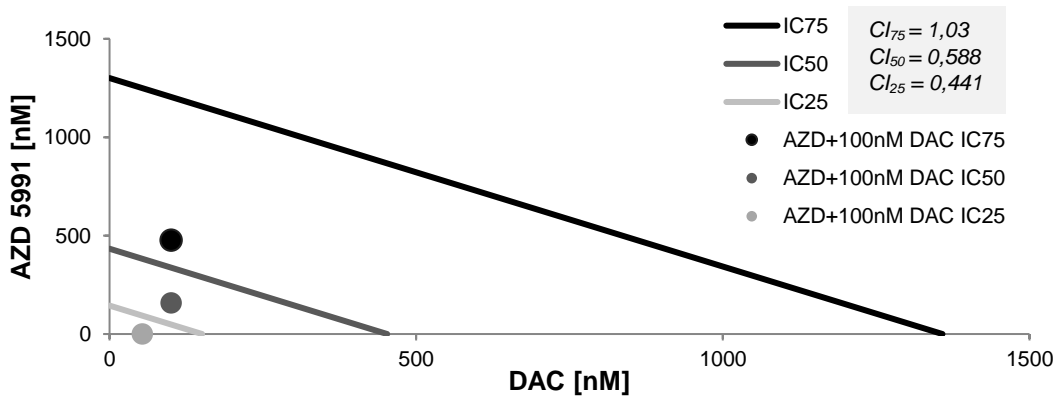


**Abb. 39:** Isobologramm Kombinationsbehandlung AZD 5991 + DAC an MOLM-13-Zellen

### 3.3.3.2. MOLM-14

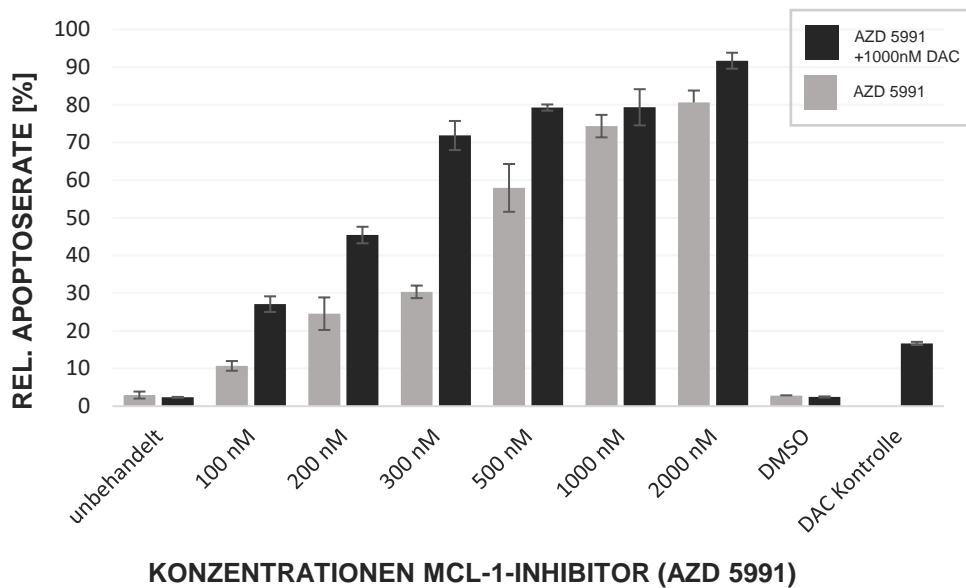


**Abb. 40:** Vergleich der Apoptoserate (Annexin-PI-Assay) der AML- Zelllinie MOLM-14 nach 48 Stunden Behandlung AZD 5991 -DAC (hellgrau) und AZD 5991 + 100nM DAC (dunkelgrau): Der mittlere Unterschied zwischen den Reihen beträgt 25,69%. Der Interaktionsfaktor ist 7,947 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) und der Säulenfaktor 11,69 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

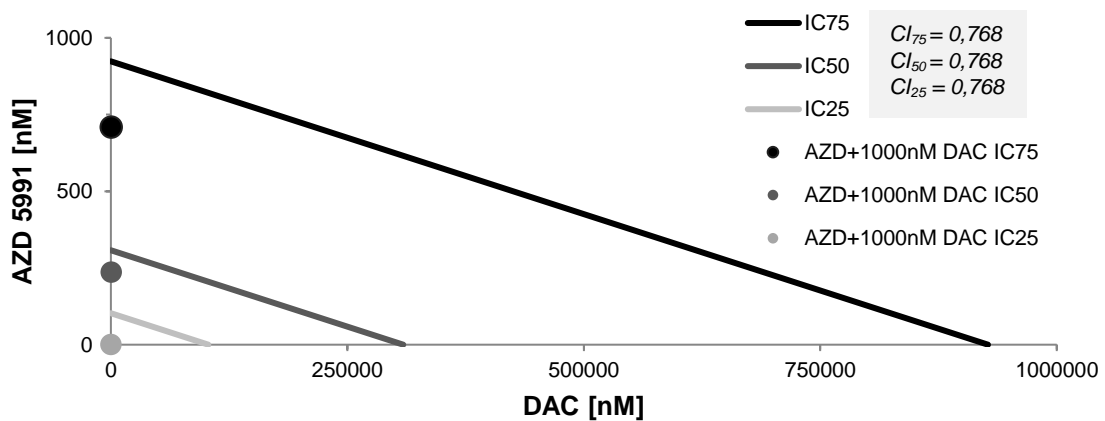


**Abb. 41:** Isobologramm Kombinationsbehandlung AZD 5991 + DAC an MOLM-14-Zellen

### 3.3.3.3. OCI-AML3

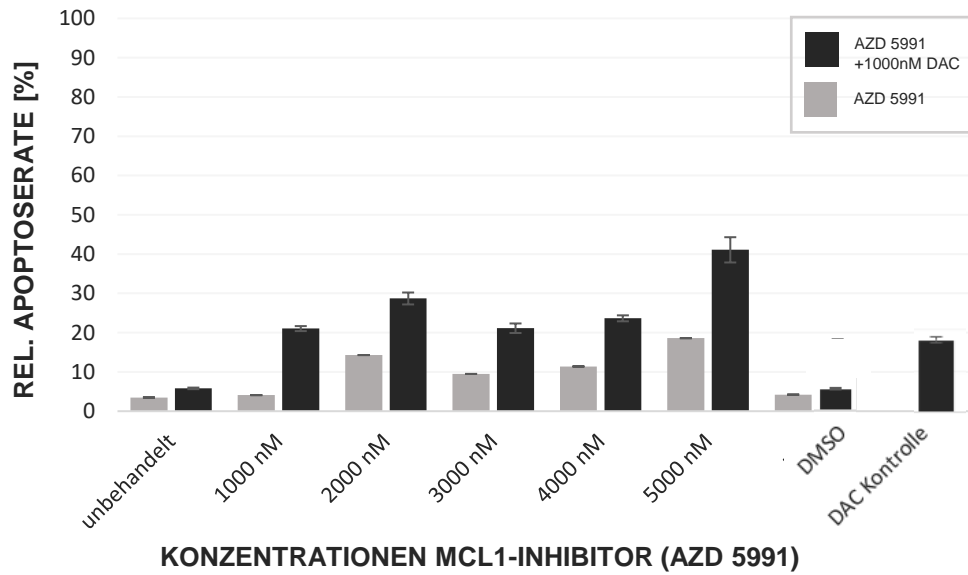


**Abb. 42:** Vergleich der Apoptoserate (Annexin-PI-Assay) der AML- Zelllinie OCI AML3 nach 48 Stunden Behandlung AZD 5991 -DAC (hellgrau) und AZD 5991 + 1000nM DAC (dunkelgrau): Der mittlere Unterschied zwischen den Reihen beträgt 8,443%. Der Interaktionsfaktor ist 1,168 ( $p = 0,0809$ ) und der Säulenfaktor 1,463 (\*\* $p < 0,0004$ ).



**Abb. 43:** Isobologramm Kombinationsbehandlung AZD 5991 + DAC an OCI AML3-Zellen

### 3.3.3.4. HL-60



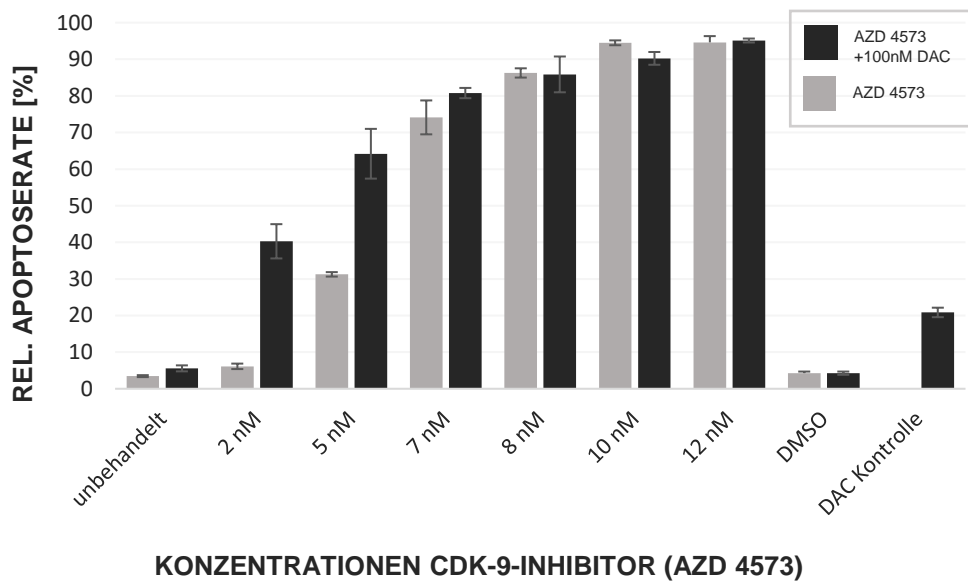
**Abb. 44:** Vergleich der Apoptoserate (Annexin-PI-Assay) der AML- Zelllinie HL-60 nach 48 Stunden Behandlung AZD 5991 -DAC (hellgrau) und AZD 5991 + 1000nM DAC (dunkelgrau): Der mittlere Unterschied zwischen den Reihen beträgt 6,261%. Der Interaktionsfaktor ist 5,451 ( $p = 0,38$  und der Säulenfaktor 12,4 (\*\*\*)  $p < 0,0006$ ).



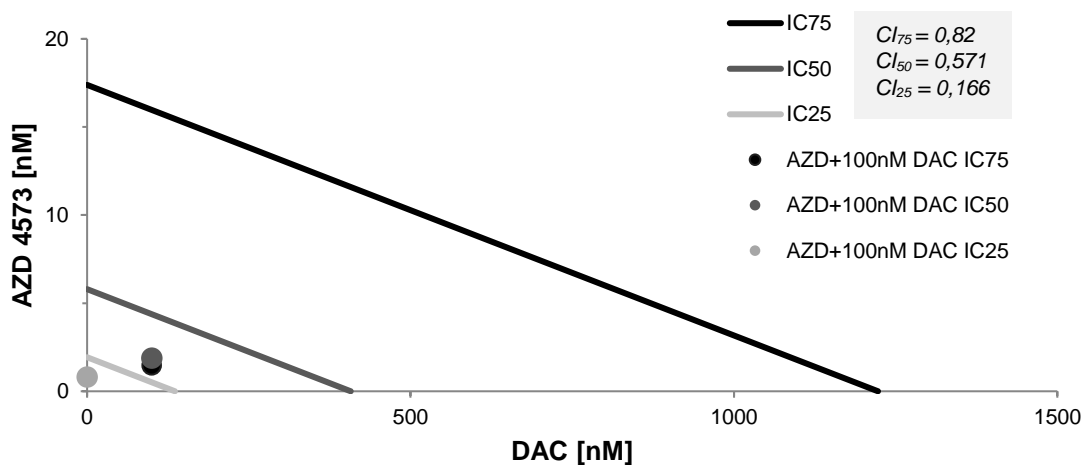
### 3.3.4. Apoptose-Induktion durch Kombination von AZD 4573 (CDK-9-Inhibitor) mit Decitabin (DAC) an AML-Zelllinien

Ebenfalls beim CDK-9-Inhibitor konnten bei allen vier Zelllinien in Kombination mit DAC synergistische Effekte erzielt werden. Diese waren durchschnittlich schwächer als beim BCL-2/-XL bzw. MCL-1-Inhibitor.

#### 3.3.4.1. MOLM-13

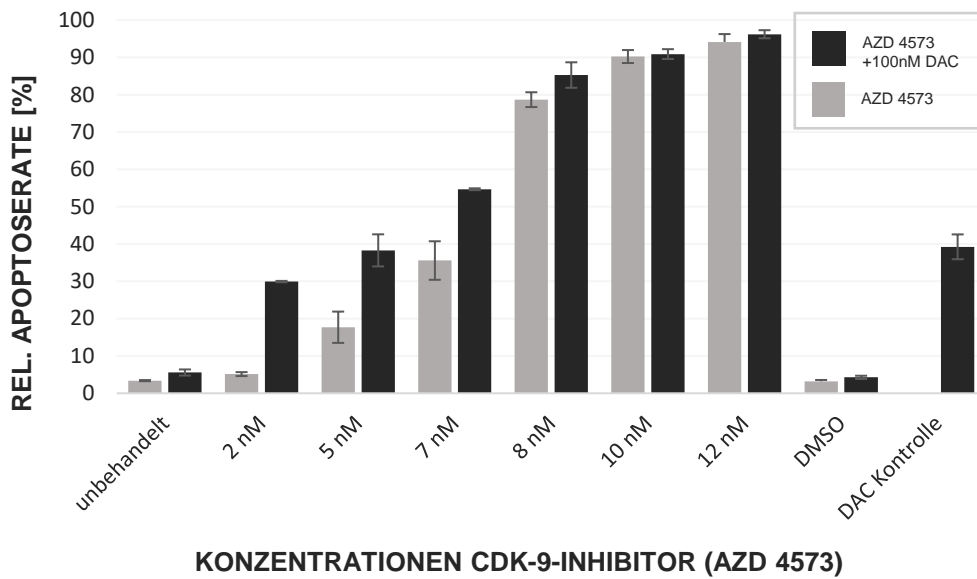


**Abb. 45:** Vergleich der Apoptoserate (Annexin-PI-Assay) der AML- Zelllinie MOLM-13 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4573 -DAC (hellgrau) und AZD 4573 + 100nM DAC (dunkelgrau): Der mittlere Unterschied zwischen den Reihen beträgt 10,24%. Der Interaktionsfaktor ist 4,619 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) und der Säulenfaktor 2,142 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

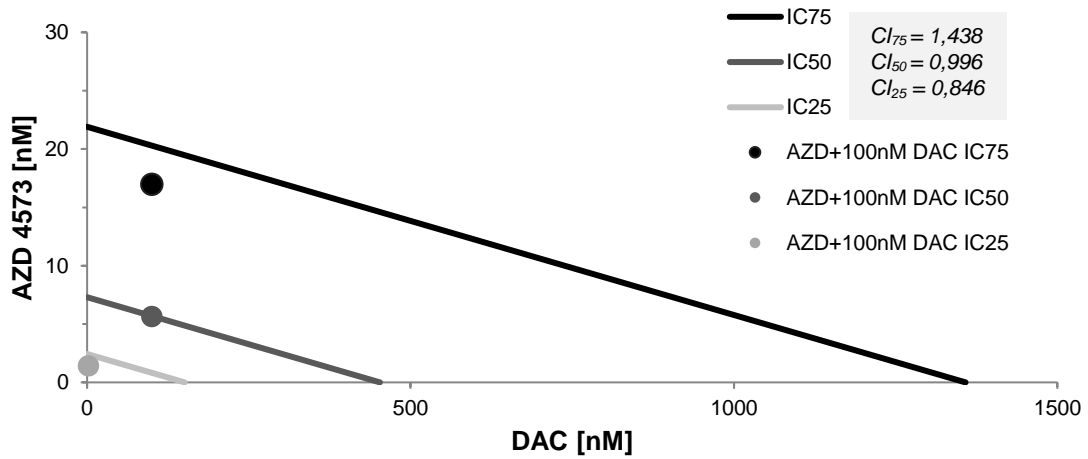


**Abb. 46:** Isobologramm Kombinationsbehandlung AZD 4573 + DAC an MOLM-13-Zellen

### 3.3.4.2. MOLM-14

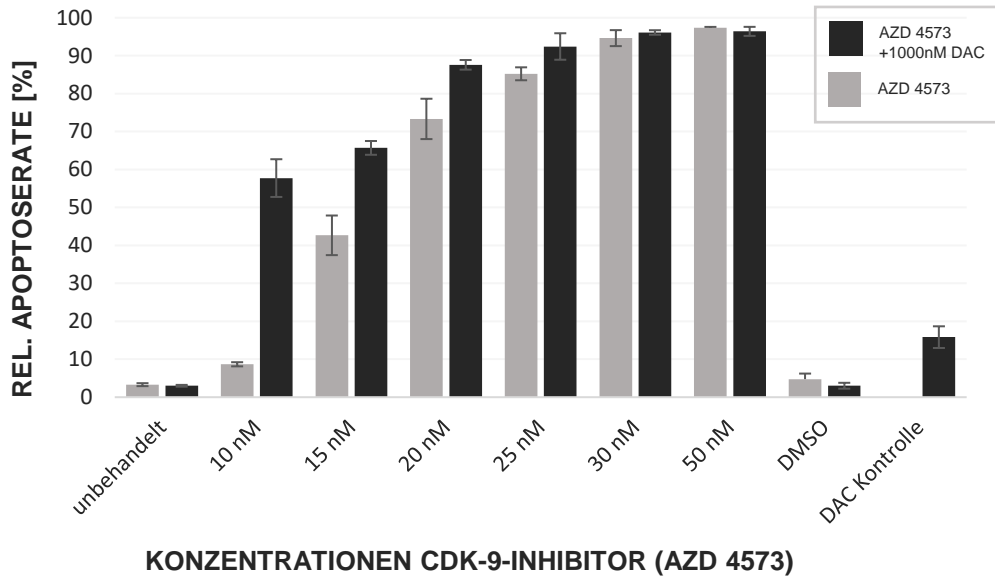


**Abb. 47:** Vergleich der Apoptoserate (Annexin-PI-Assay) der AML- Zelllinie MOLM-14 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4573 -DAC (hellgrau) und AZD 4573 + 100nM DAC (dunkelgrau): Der mittlere Unterschied zwischen den Reihen beträgt 10,86%. Der Interaktionsfaktor ist 1,794 \*\*\* p=0,0003) und der Säulenfaktor 2,344 (\*\*\*\* p<0,0001).

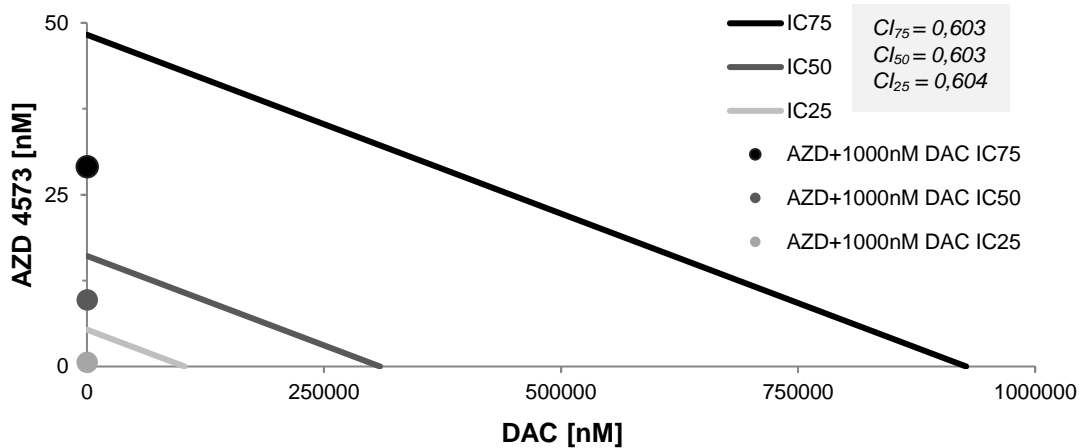


**Abb. 48:** Isobologramm Kombinationsbehandlung AZD 4573 + DAC an MOLM-14-Zellen

### 3.3.4.3. OCI-AML3

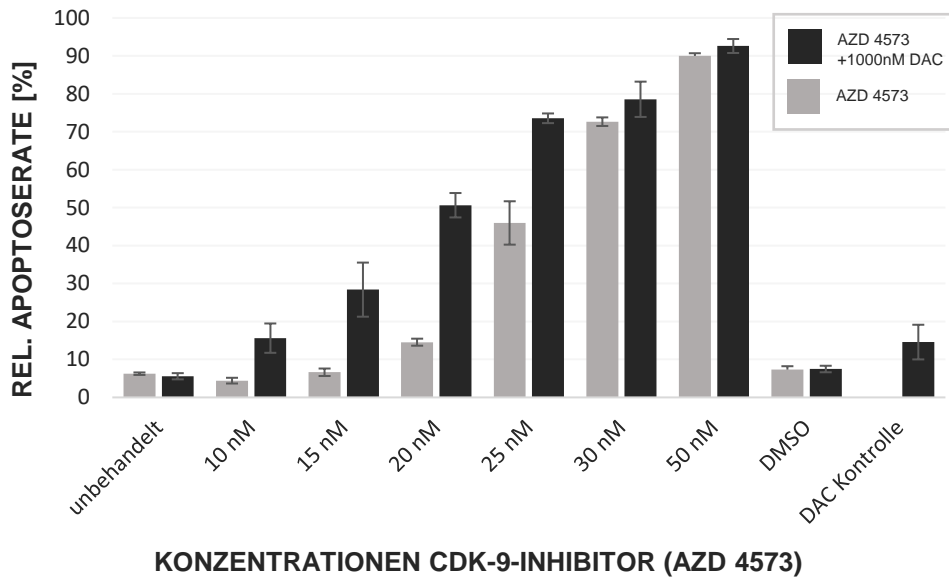


**Abb. 49:** Vergleich der Apoptoserate (Annexin-PI-Assay) der AML- Zelllinie OCI AML3 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4573 -DAC (hellgrau) und AZD 4573 + 100nM DAC (dunkelgrau): Der mittlere Unterschied zwischen den Reihen beträgt 13,4%. Der Interaktionsfaktor ist 5,615 \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) und der Säulenfaktor 3,636 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

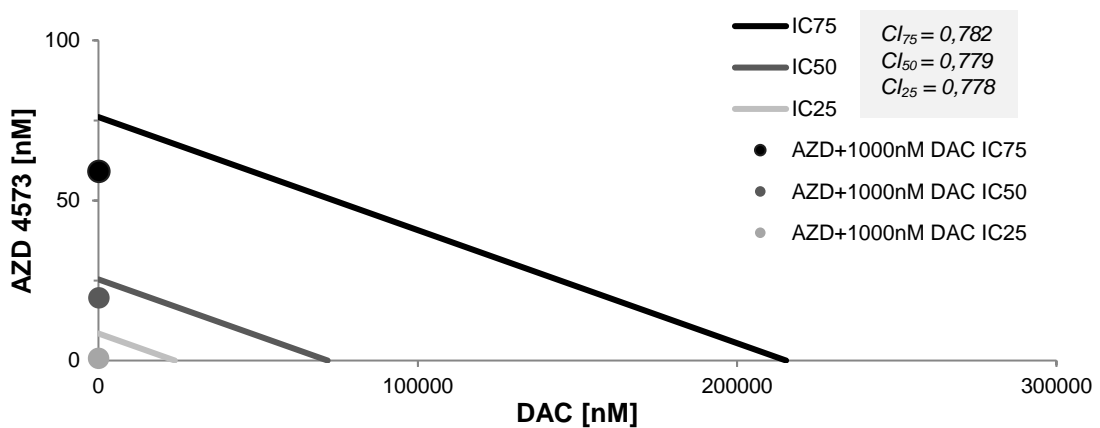


**Abb. 50:** Isobologramm Kombinationsbehandlung AZD 4573 + DAC an OCI AML3-Zellen

### 3.3.4.4. HL-60



**Abb. 51:** Vergleich der Apoptoserate (Annexin-PI-Assay) der AML- Zelllinie HL-60 nach 48 Stunden Behandlung AZD 4573 -DAC (hellgrau) und AZD 4573 + 100nM DAC (dunkelgrau): Der mittlere Unterschied zwischen den Reihen beträgt 14,93%. Der Interaktionsfaktor ist 3,693 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) und der Säulenfaktor 5,03 (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).



**Abb. 52:** Isobologramm Kombinationsbehandlung AZD 4573 + DAC an HL-60-Zellen

**Tab. 8: Gesamtüberblick IC<sub>25</sub>-, IC<sub>50</sub>- & IC<sub>75</sub>-Werte aller Zelllinien & Inhibitoren**

**Dualer BCL-2/XL-Inhibitor (AZD 4320)**

	<i>IC<sub>25</sub></i>		<i>IC<sub>50</sub></i>		<i>IC<sub>75</sub></i>	
	<i>-DAC</i>	<i>+DAC</i>	<i>-DAC</i>	<i>+DAC</i>	<i>-DAC</i>	<i>+DAC</i>
<b>MOLM-13</b>	1,8	0,0006	5,3	0,0019	16,0	0,0056
<b>MOLM-14</b>	20,0	1,5	60,0	4,6	180,1	13,7
<b>OCI AML3</b>	-	-	-	-	-	-
<b>HL-60</b>	-	-	-	-	-	-

**MCL-1-Inhibitor (AZD 5991)**

	<i>IC<sub>25</sub></i>		<i>IC<sub>50</sub></i>		<i>IC<sub>75</sub></i>	
	<i>-DAC</i>	<i>+DAC</i>	<i>-DAC</i>	<i>+DAC</i>	<i>-DAC</i>	<i>+DAC</i>
<b>MOLM-13</b>	7,6	0,4	22,7	1,2	679,5	3,7
<b>MOLM-14</b>	144,5	53,0	433,5	159,1	1300,5	477,3
<b>OCI AML3</b>	102,6	78,8	307,8	236,3	923,4	708,9
<b>HL-60</b>	-	-	-	-	-	-

**selektiver CDK-9-Inhibitor (AZD 4573)**

	<i>IC<sub>25</sub></i>		<i>IC<sub>50</sub></i>		<i>IC<sub>75</sub></i>	
	<i>-DAC</i>	<i>+DAC</i>	<i>-DAC</i>	<i>+DAC</i>	<i>-DAC</i>	<i>+DAC</i>
<b>MOLM-13</b>	1,9	0,1625	5,8	0,4877	17,4	1,5
<b>MOLM-14</b>	2,4	1,9	7,3	5,7	21,9	17,0
<b>OCI AML3</b>	5,4	3,2	16,1	9,7	48,3	29,1
<b>HL-60</b>	8,4	6,6	25,4	19,7	76,1	59,1

**Decitabin (DAC)**

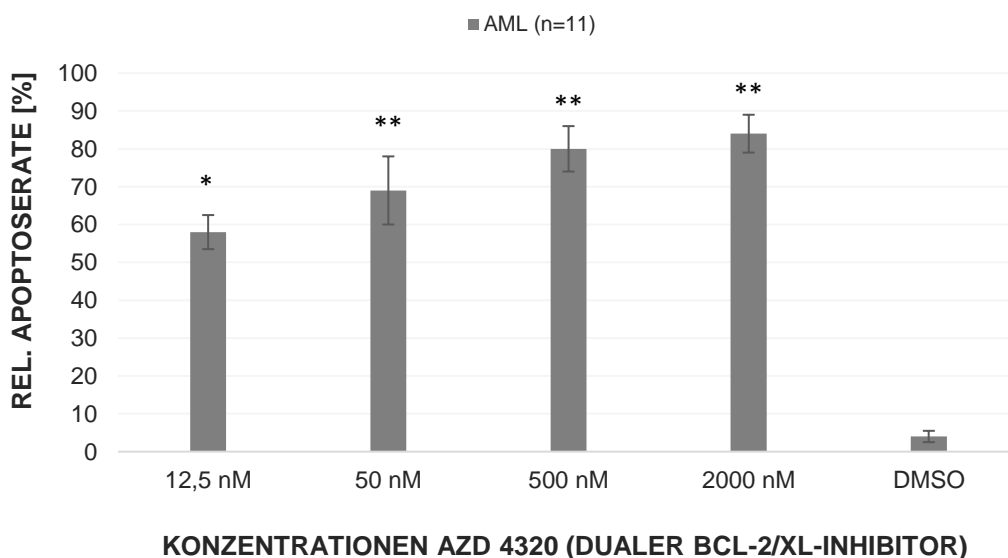
	<i>IC<sub>25</sub></i>	<i>IC<sub>50</sub></i>	<i>IC<sub>75</sub></i>
<b>MOLM-13</b>	135,9	407,6	1222,8
<b>MOLM-14</b>	150,9	452,7	1358,1
<b>OCI AML3</b>	103033,3	309100	927300
<b>HL-60</b>	23926,6	71780	215340

- IC<sub>50</sub> nicht erreichbar/bestimmbar

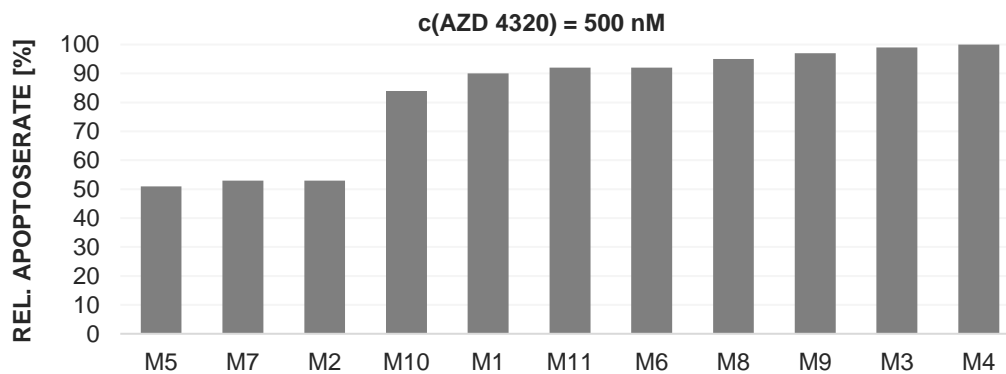
### 3.4. Inhibitoren reduzieren dosisabhängig die Anzahl von AML-Blasten *ex-vivo*

Aufgrund der starken Apoptose-Effekte, die sich bei den Zelllinien *in-vitro* ergaben, wurde in einem nächsten Schritt das apoptotische Potential *ex-vivo* an aus Heparin-Blut- oder -Knochenmark von neu diagnostizierten AML-Patienten bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=3) aller AML-Patienten, sowie das Ansprechen der einzelnen Patientenproben bei einer definierten Inhibitor-Konzentration. Fehlerbalken zeigen  $\pm 1$  Standard-Abweichung der gemessenen Werte. DMSO dient als Kontrolle. Die statistische Auswertung wurde mittels einfacher Varianzanalyse und dem Dunnett-Test als Post-hoc-Analyse durchgeführt.

#### 3.4.1. AZD 4320 (dualer BCL-2/X<sub>L</sub>-Inhibitor) reduziert dosisabhängig die Anzahl von AML-Blasten *ex-vivo*

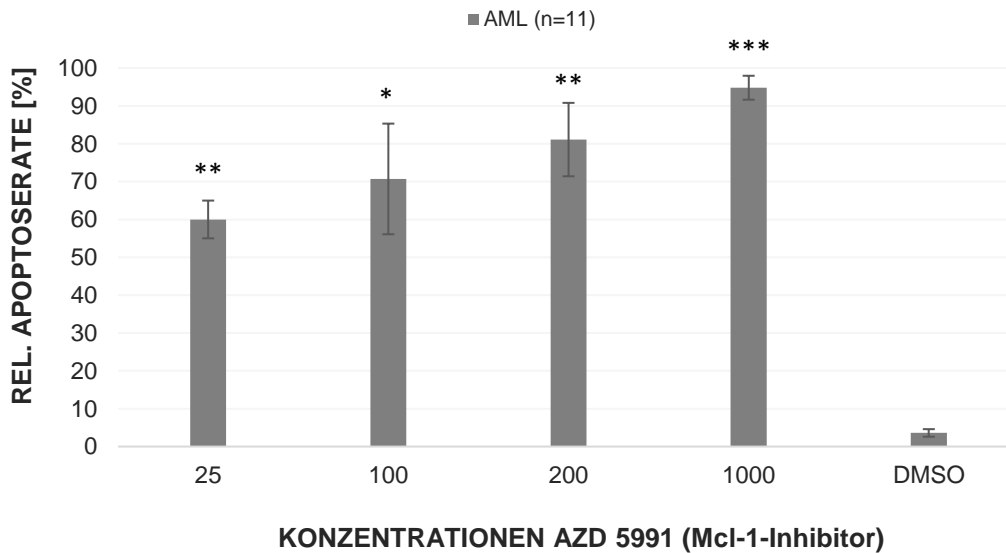


**Abb. 53:** Apoptose-Induktion an PBMCs isoliert aus Heparin-Blut/-Knochenmark von neu-diagnostizierten AML-Patienten nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 4320



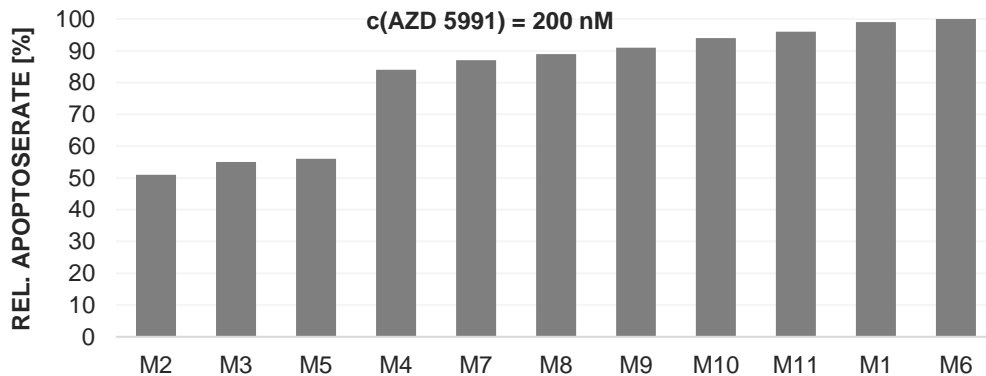
**Abb. 54:** Relative Apoptoseraten der AML-Patientenzellen (M1-M11) im Vergleich nach 48h Behandlung mit einer Konzentration von 500 nM AZD 4320 (dualer BCL-2/X<sub>L</sub>-Inhibitor)

### 3.4.2. AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) reduziert dosisabhängig die Anzahl von AML-Blasten ex-vivo



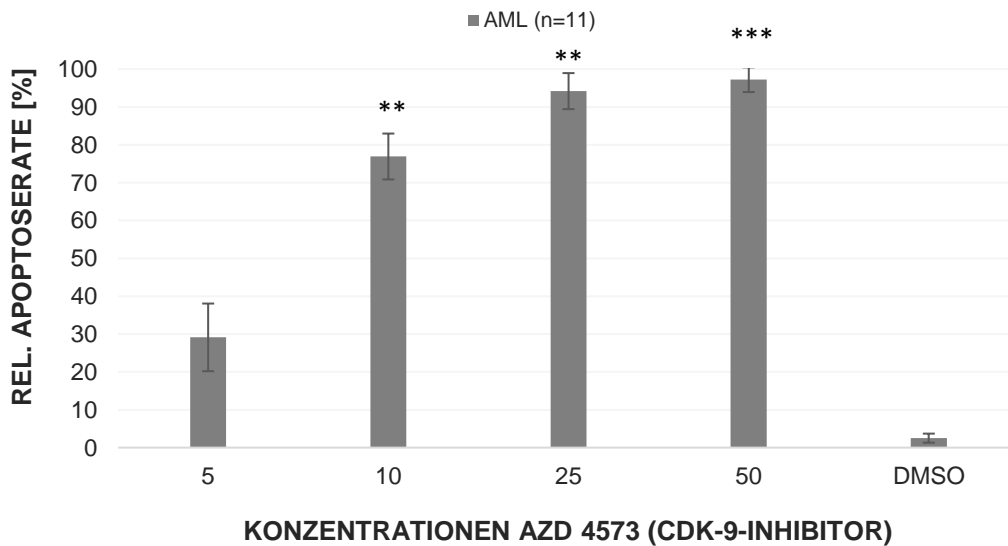
**Abb. 55:** Apoptose-Induktion an PBMCs isoliert aus Heparin-Blut/-Knochenmark von neu-diagnostizierten AML-Patienten nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 5991

Beim MCL-1-Inhibitor zeigte sich ein vergleichbares Bild wie beim BCL-2/-X<sub>L</sub>-Inhibitor bei minimal höheren Dosiskonzentrationen.



**Abb. 56:** Relative Apoptoseraten der AML-Patientenzellen (M1-M11) im Vergleich nach 48h Behandlung mit einer Konzentration von 200 nM AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor)

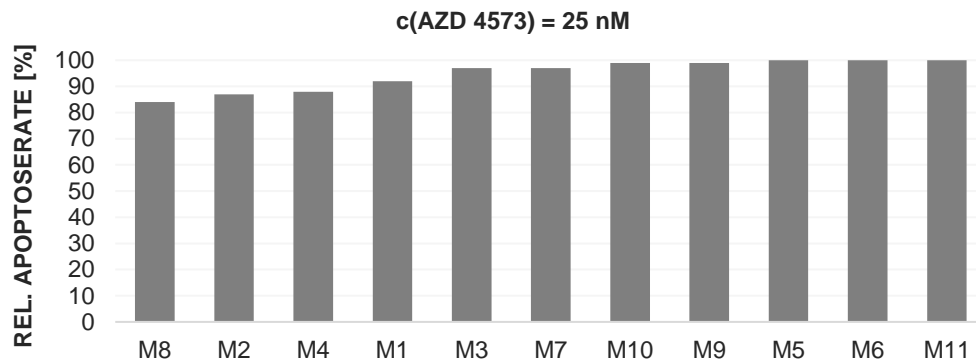
### 3.4.3. AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) reduziert dosisabhängig die Anzahl von AML-Blasten ex-vivo



**Abb. 57:** Apoptose-Induktion an PBMCs isoliert aus Heparin-Blut-/Knochenmark von neu-diagnostizierten AML-Patienten nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 4573 (CDK-9-Inhibitor)

Der CDK-9-Inhibitor war am sensitivsten und zeigte bei geringeren Konzentrationen eine hohe Apoptoserate.





**Abb. 58:** Relative Apoptoseraten der AML-Patientenzellen (M1-M11) im Vergleich nach 48h Behandlung mit einer Konzentration von 25 nM AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor)

Die getestete AML-Patientenkohorte (n=11) war mit  $\bar{x}$  60,727 Jahren eher jung und überwiegend männlich (n= 9 = 81,812%) (vgl. Tab. 12). Gehäuft kamen zusätzlich sAML aus MDS vor (n=4 = 36,363%). Positive Zusammenhänge bezüglich des Ansprechens der einzelnen Inhibitoren und Genetik oder Epidemiologie konnten hier aufgrund der geringen Anzahl getesteter AML-Proben nicht nachgewiesen werden.

**Tab.9:** Klinische & epidemiologische Charakteristika der AML-Patienten-Kohorte

	Diagnose	Blasten [%]	Material	Alter		
<b>M1</b>	AML	37	KM	46	♂	†
<b>M2</b>	sAML aus MDS	30,5	KM	50	♂	†
<b>M3</b>	sAML aus MDS	80	KM	74	♂	†
<b>M4</b>	sAML aus MDS	29	pB	82	♂	†
<b>M5</b>	sAML aus MDS	15	pB	78	♂	†
<b>M6</b>	AML	70	pB	50	♂	†
<b>M7</b>	AML	k.A.	pB	75	♂	†
<b>M8</b>	AML	82	pB	44	♂	†
<b>M9</b>	AML	88	pB	66	♂	†
<b>M10</b>	AML	20,5	pB	46	♀	-
<b>M11</b>	AML	89	pB	57	♀	-

KM = Knochenmark, pB = peripheres Blut, k.A. = keine Angabe

**Tab.10:** Genetische Eigenschaften der AML-/ALL-Patienten-Kohorten

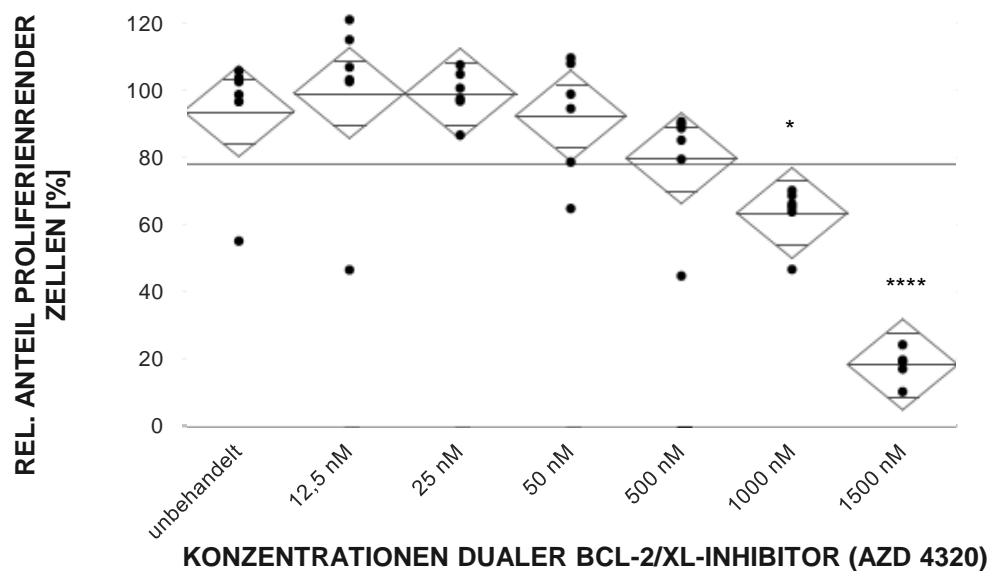
	Molekulargenetik				Zytogenetik	Molekulargenetik				Zytogenetik
	FLT3	NPM1	andere	Besonderheiten		FLT3	NPM1	andere	Besonderheiten	
<b>M1</b>	+	-	-	≥3 Aberrationen	<b>M7</b>	-	-	-	-	
<b>M2</b>	-	-	-	del(7)	<b>M8</b>	-	-	CEPB A+	-	
<b>M3</b>	-	-	IDH2+	-	<b>M9</b>	+	-	-	-	
<b>M4</b>	+	-	-	-	<b>M10</b>	+	+	-	-	
<b>M5</b>	+	+	IDH2+	del(16)(q22;q22)	<b>M11</b>	-	+	-	-	
<b>M6</b>	-	-	-	Trisomie 8						

### 3.5. Antiproliferative Wirkung und Apoptose-Induktion der BCL-2-Inhibitoren im ALL-Modell

#### 3.5.1. Antiproliferatives Wirkung von AZD 4320 (BCL-2/X<sub>L</sub>-Inhibitor) auf die ALL-Zelllinie Jurkat

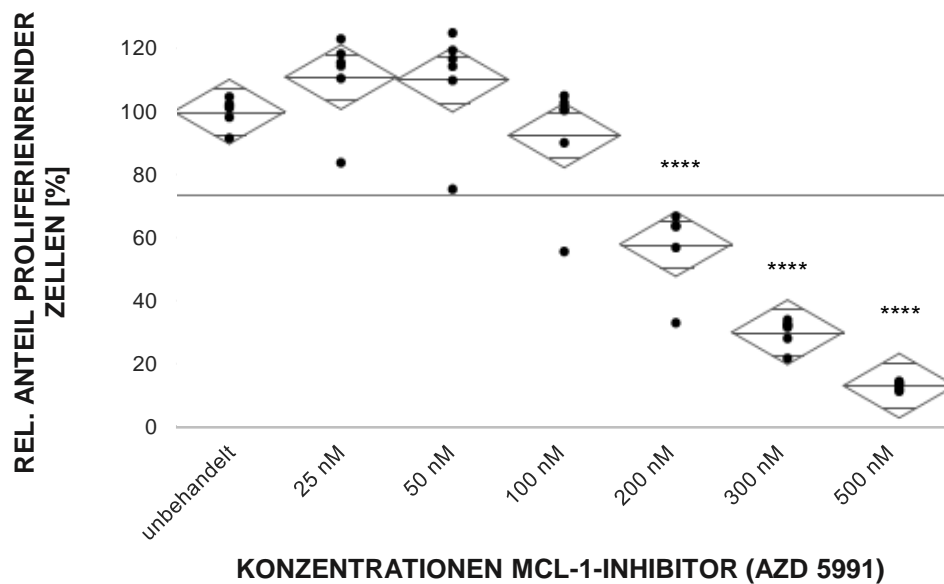
Bei allen drei Inhibitoren zeigte die T-ALL-Zelllinie Jurkat ein dosisabhängiges Ansprechen mit Reduktion der Ausgangsproliferationsrate um >80%. Am sensitivsten reagierten die Zellen auf den CDK-9-Inhibitor.

##### 3.5.1.1. Antiproliferative Wirkung von AZD 4320 (BCL-2/X<sub>L</sub>-Inhibitor) auf die ALL-Zelllinie Jurkat



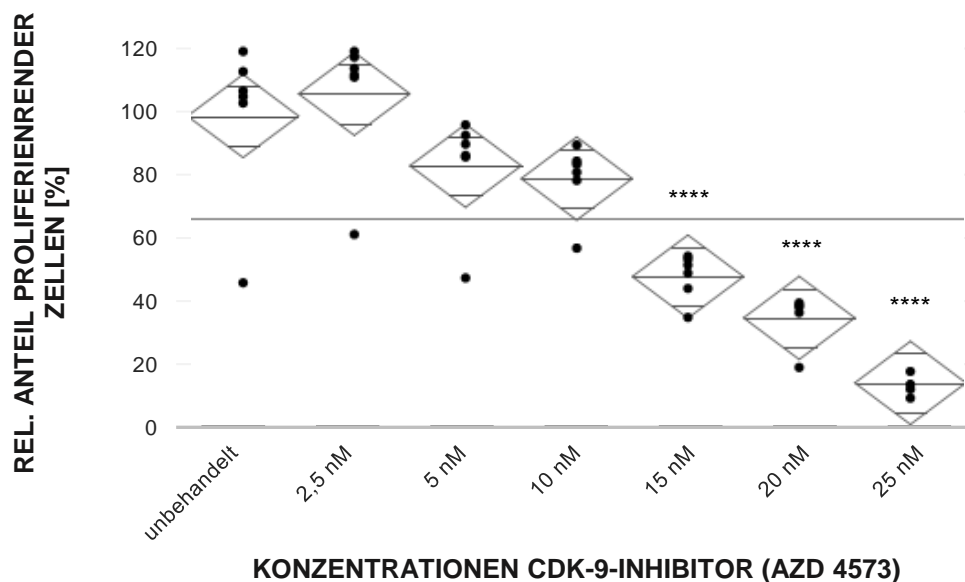
**Abb. 59:** Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4320 (dualer BCL-2-/X<sub>L</sub>-Inhibitor) bei der ALL-Zelllinie Jurkat (XTT-Assay)

### 3.5.1.2. Antiproliferative Wirkung von AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) auf die ALL-Zelllinie Jurkat



**Abb. 60:** Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) bei der ALL-Zelllinie Jurkat (XTT-Assay)

### 3.5.1.3. Antiproliferative Wirkung von AZD 4573 (CDK-9-Inhibitor) auf die ALL-Zelllinie Jurkat

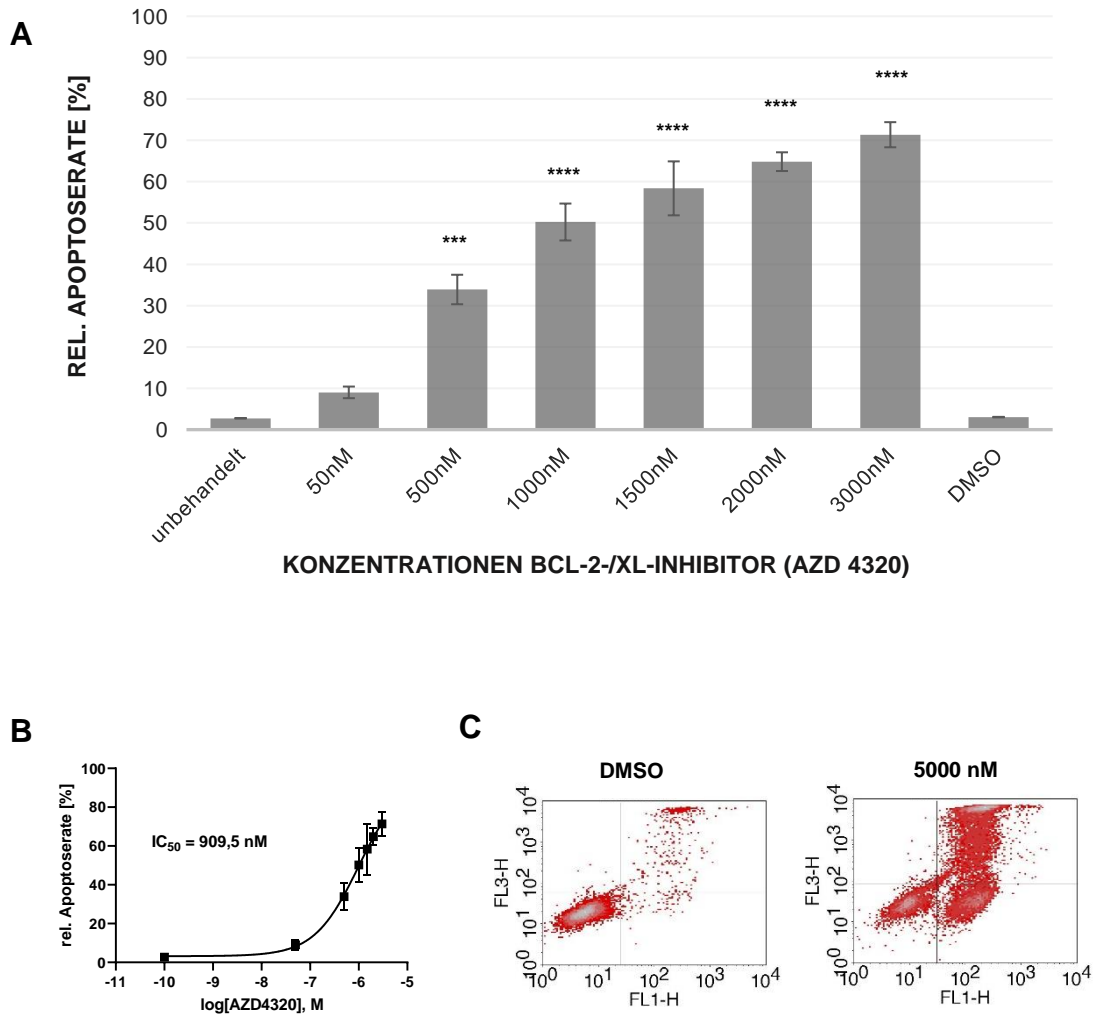


**Abb. 61:** Hemmung der Proliferation nach 24 Stunden Behandlung mit AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) bei der ALL-Zelllinie Jurkat (XTT-Assay)

### **3.5.2. Apoptose-Induktion durch die BCL-2-Inhibitoren in der ALL-Zelllinie Jurkat**

Apoptose konnte durch alle Inhibitoren dosisabhängig induziert werden. Ebenfalls reagierten sie auf den CDK-9-Inhibitor mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 20,66 nM am sensitivsten. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=3) der relativen Apoptoserate. Die Fehlerbalken zeigen  $\pm 1$  Standard-Abweichung der gemessenen Werte. Die \*-Sterne stehen für entsprechend definierte Fehlerniveaus (vgl. Tab.7). DMSO dient als Negativkontrolle. Statistisch ausgewertet wurden die Ergebnisse mittels ANOVA und Dunnett post-hoc.

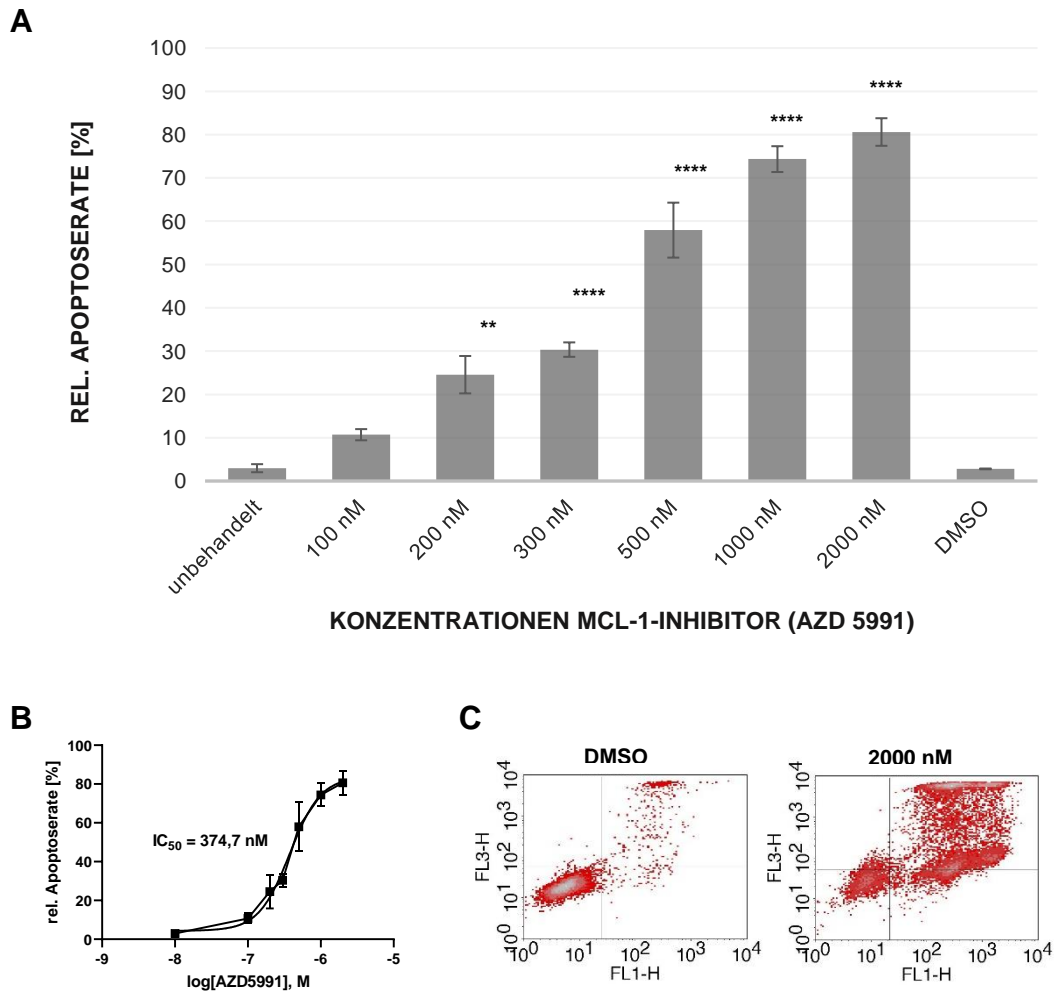
### 3.5.2.1. AZD 4320 (dualer Bcl-2/XL-Inhibitor) induziert dosisabhängig Apoptose in Jurkat-Zellen



**Abb. 62:** Dosisabhängige Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der ALL-Zelllinie Jurkat nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 4320

A: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptose-Rate in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration, B: logarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurve mit errechneter  $IC_{50}$ , C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch), DMSO als Kontrolle und  $c[AZD 4320] = 5000 \text{ nm}$

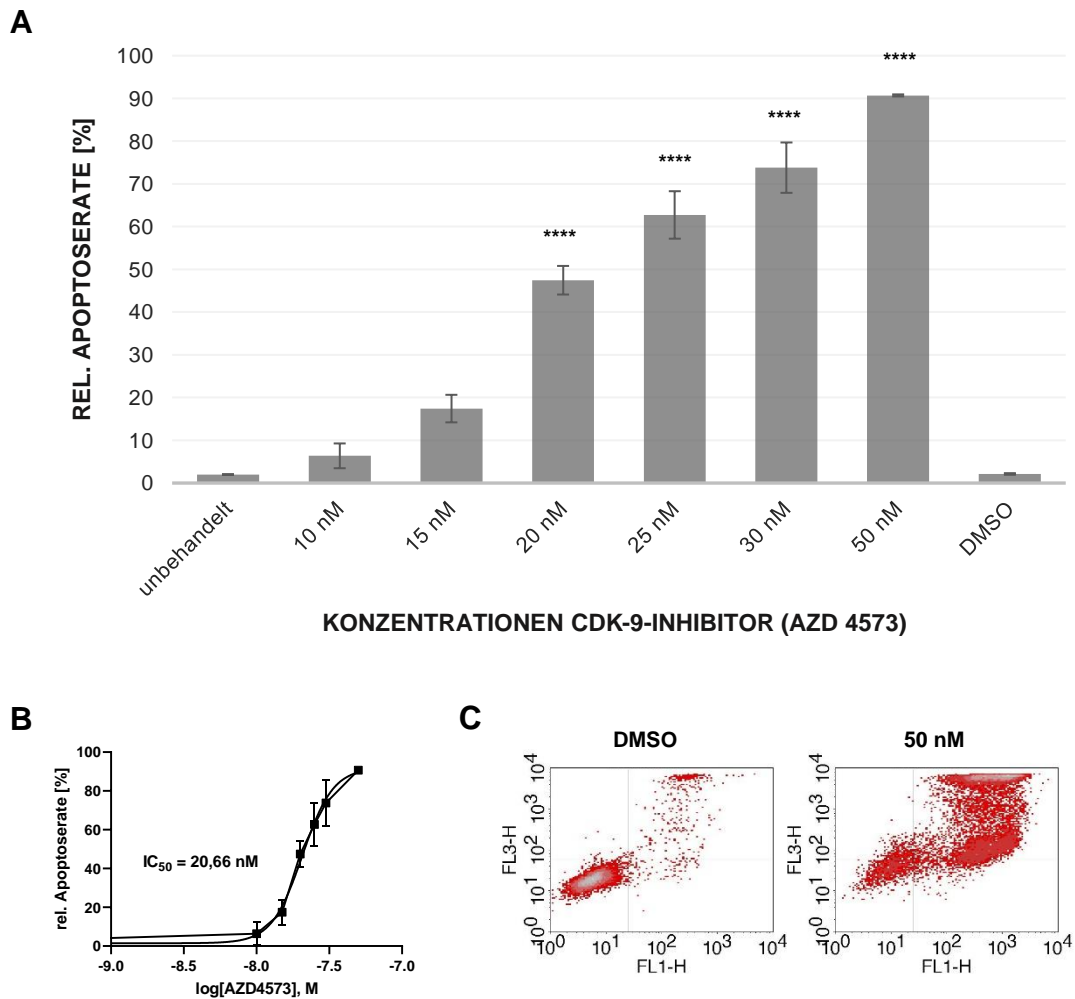
### 3.5.2.2. AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) induziert dosisabhängig Apoptose in Jurkat-Zellen



**Abb. 63: Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der ALL-Zelllinie Jurkat nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 5991**

A: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptose-Rate in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration, B: logarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurve mit errechneter  $IC_{50}$ , C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch), DMSO als Kontrolle und  $c[AZD 5991] = 2000 \text{ nM}$

### 3.5.2.3. AZD 4573 (selektiver CDK-9-Inhibitor) induziert dosisabhängig Apoptose in Jurkat-Zellen



**Abb. 64:** Dosisabhängige Apoptose-Induktion (Annexin-PI-Assay) bei der AML-Zelllinie HL-60 nach 48 Stunden Behandlung mit selektivem CDK-9-Inhibitor (AZD 4573)

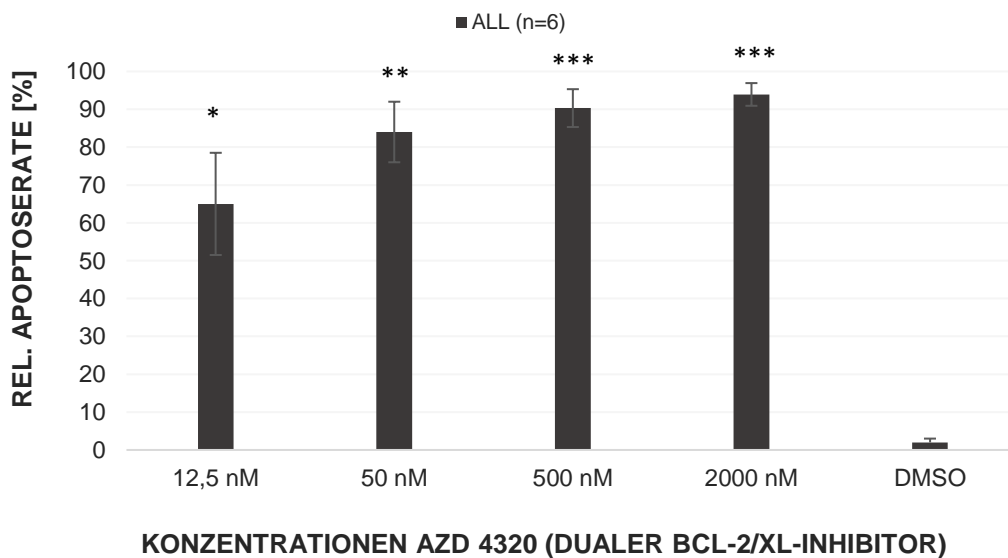
A: Säulendiagramm mit Darstellung der relativen Apoptose-Rate in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration, B: logarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurve mit errechneter  $IC_{50}$ , C: Dotplot-Diagramme (exemplarisch), DMSO als Kontrolle und  $c[AZD 4573] = 50 \text{ nM}$



### 3.5.3. Inhibitoren reduzieren dosisabhängig die Anzahl von ALL-Blasten ex-vivo

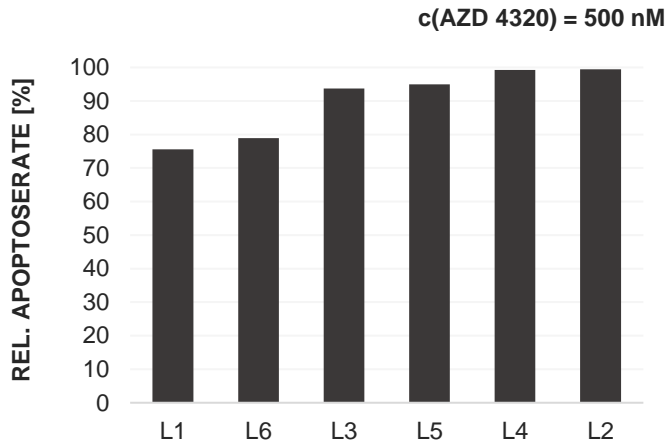
Analog zu den AML-Patientenproben testeten wir das Ansprechen der Inhibitoren ex-vivo auf ALL-Blasten isoliert aus Heparin-Blut bzw. - Knochenmark. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=3) der relativen Apoptoserate aller gemessener ALL-Patientenproben. Fehlerbalken zeigen  $\pm 1$  Standard-Abweichung der gemessenen Werte. Als statistische Tests dienten einfache Varianzanalysen mit Dunnett als post-hoc-Test.

#### 3.5.3.1. AZD 4320 (dualer BCL-2/-XL-Inhibitor) reduziert dosisabhängig ALL-Blasten ex-vivo



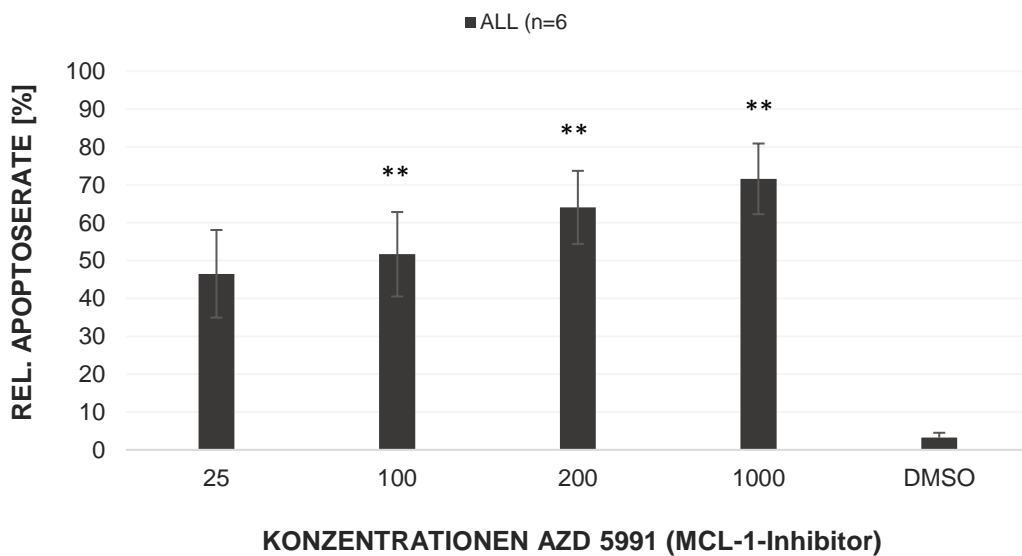
**Abb. 65:** Apoptose-Induktion an PBMCs isoliert aus Heparin-Blut/-Knochenmark von neu-diagnostizierten ALL-Patienten nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 4320 (BCL-2/-XL-Inhibitor)

Es zeigt sich in ähnlichen Bereichen wie bei den AML-Blasten ein dosisabhängiges Ansprechen der ALL-Blasten unter Behandlung mit dem BCL-2/-XL-Inhibitor.

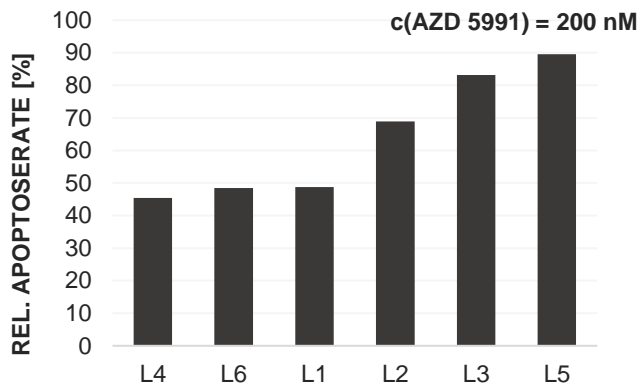


**Abb. 66:** Relative Apoptoseraten der ALL-Patientenzellen (L1-L6) im Vergleich nach 48h Behandlung mit einer Konzentration von 500 nM AZD 4320 (dualer BCL-2/-X<sub>L</sub>-Inhibitor)

### 3.5.3.2. AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) reduziert dosisabhängig ALL-Blasten ex-vivo

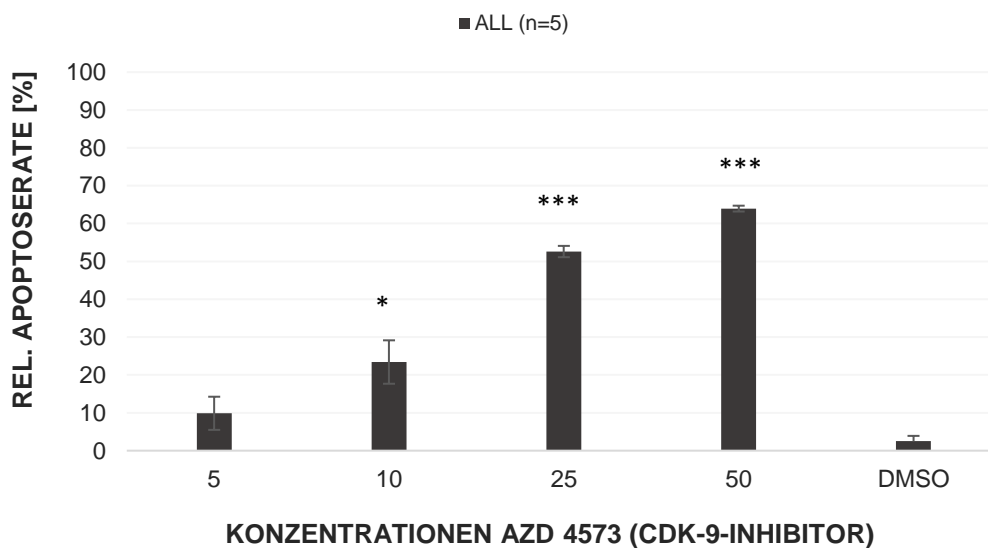


**Abb. 67:** Apoptose-Induktion an PBMCs isoliert aus Heparin-Blut/-Knochenmark von neu-diagnostizierten ALL-Patienten nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor)

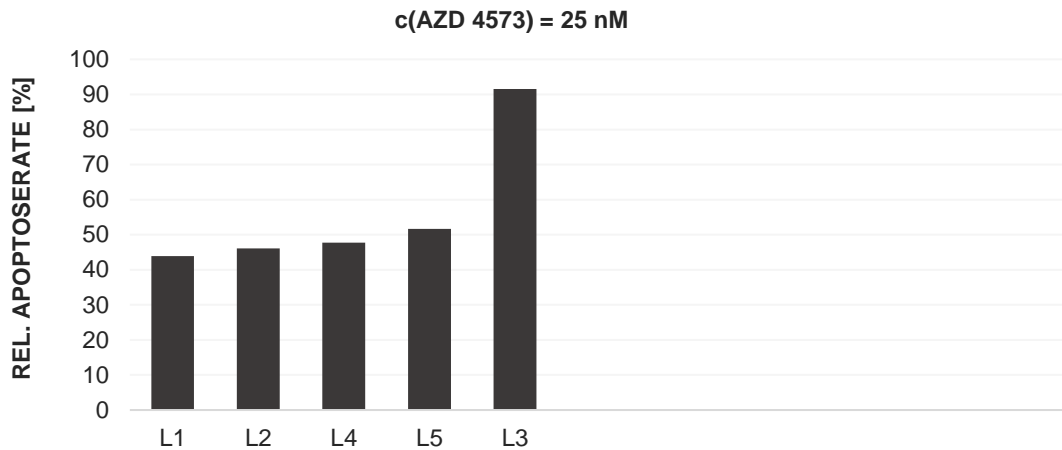


**Abb. 68:** Relative Apoptoseraten der ALL-Patientenzellen (L1-L6) im Vergleich nach 48h Behandlung mit einer Konzentration von 200 nM AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor)

### 3.5.3.3. AZD 4573 (CDK-9-Inhibitor) reduziert dosisabhängig ALL-Blasten ex-vivo



**Abb. 69:** Apoptose-Induktion an PBMCs isoliert aus Heparin-Blut von neu-diagnostizierten ALL-Patienten nach 48 Stunden Behandlung mit AZD 4573 (CDK-9-Inhibitor)



**Abb. 70:** Relative Apoptoseraten der ALL-Patientenzellen (L1-L6) im Vergleich nach 48h Behandlung mit einer Konzentration von 25 nM AZD 4573 (CDK-9-Inhibitor)

Bei den ALL-Patienten war das Geschlechterverhältnis ausgeglichen und das Erkrankungsalter lag bei  $\bar{\varnothing}$  51,6 Jahren.

**Tab.11:** Klinische & epidemiologische Charakteristika der ALL-Patienten-Kohorte

	Diagnose	Blasten [%]	Material	Alter			
L1	ALL	k.A.	KM	76	♂	-	
L2	c-ALL	94	pB	49	♂	-	
L3	Prä-B-ALL	89	pB	22	♀	-	
L4	Prä-T-ALL	44	pB	21	♂	-	
L5	ALL	k.A.	pB	61	♀	-	
L6	c-ALL	k.A.	pB	81	♀	†	

KM = Knochenmark, pB = peripheres Blut, k.A. = keine Angabe

**Tab.12:** Zytogenetische Eigenschaften der ALL-Patienten-Kohorte

	L1	L2	L3	L4	L5	L6
BCR-ABL t(9;22)	+	-	-	-	-	k.a.
E2A-PBX1 t(1;19)	-	-	+	-	-	-

## 4. Diskussion

Die Diagnose „Akute myeloische Leukämie“ bleibt für die meisten erwachsenen Patienten ungünstig. Insbesondere bei älteren Patienten mit schwerwiegenden Komorbiditäten, wie Leber-/Nieren- und/oder Herzinsuffizienz, ist häufig weder eine aggressive Chemotherapie noch eine Stammzelltransplantation möglich und die Chance ein Rezidiv zu erleiden, erhöht sich signifikant. [82] [83] Trotz wegweisender neuer Erkenntnisse in der AML-Pathogenese gelangen in den letzten 15 Jahren kaum therapeutische Durchbrüche.

Die EU-Zulassung des BCL-2-Inhibitors Venetoclax mit hypomethylierenden Substanzen im Jahr 2021, sowie die Aufnahme dieser Kombination in aktuelle Behandlungsleitlinien der AML bei unfitten Patienten stellt einen Durchbruch dar. [84] BCL-2 ist in zahlreichen Tumorentitäten überexprimiert, besonders in AML-Blasten. [31] Der *small-molecule*-Inhibitor Venetoclax imitiert BH-3-Domänen von proapoptotischen BCL-Proteinen, die BCL-2 nach Einbau in die Mitochondrienmembran spezifisch binden und so zur Induktion des intrinsischen Wegs der Apoptose führen. [30]

Die vorliegende experimentelle Arbeit bietet eine Rationale für den klinischen Einsatz aller drei neuen getesteten BCL-pathway-Inhibitoren in Kombination mit hypomethylierenden Substanzen mit möglicher Aussicht auf einen Stellenwert in der zukünftigen AML-Therapie (und ggfs. ALL-Therapie).

Der duale BCL-2/X<sub>L</sub>-Inhibitor AZD 4320 weist ein ähnliches Wirkmuster wie Venetoclax auf - ergänzend zu BCL-2 wird das gleichermaßen anti-apoptotisch wirkende BCL-X<sub>L</sub> inhibiert. Ein stärkere Apoptose-Induktion aufgrund der Doppel-Inhibierung wäre anzunehmen. Der Inhibitor zeigte ein sehr gutes Dosis-abhängiges, *in-vitro*-Ansprechen bei den MOLM-13-, MOLM-14- und Jurkat-Zelllinien. Die höchste Affinität wies er zu MOLM-13 auf, welche bereits im niedrigeren nanomolaren Bereich in Apoptose überführt werden konnten. Deutlich niedrigere Sensitivitätslevels mit nur gering-apoptotisch bzw. antiproliferativen Effekten konnten in OCI AML3 und HL-60-Zellen erzielt werden. Eine Venetoclax-Resistenz ist bei OCI-AML3 in anderen experimentellen Studien vorbeschrieben, sodass unsere Ergebnisse damit übereinstimmen. [85] [86] Bezüglich HL-60 finden sich unterschiedliche Angaben in der Literatur. In einer

Forschungsarbeit von Pan et al. wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von etwa 10 nM unter ABT-199 ermittelt, [48] in einer anderen Veröffentlichung war keine Apoptose induzierbar. [86] Vergleicht man die präklinischen Sensitivitätsniveaus von Venetoclax mit dem hier verwendeten BCL-2/ $X_L$ -Inhibitor lagen die  $IC_{50}$ -Werte unseres Inhibitors AZD 4320 niedriger – dennoch in vergleichbaren Bereichen: bei MOLM-13 6 nM (AZD 4320) zu 10 nM (Venetoclax) und MOLM-14 60 nM (AZD 4320) zu 110 nM (Venetoclax). Analog zur Zulassung von Venetoclax mit hypomethylierenden Substanzen testeten wir die Kombination aus AZD 4320 (dualer BCL-2/ $X_L$ -Inhibitor) und dem Pyrimidin-Analogon Decitabin auf einen möglichen Synergismus. Die Überlegenheit der Venetoclax-5-Azaticidin-Kombination gegenüber der Standardtherapie mit 5-Azaticidin wurde u.a. durch DiNardo et. al. in einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie bestätigt. Bei Patienten über 75 Jahren konnte das Gesamtüberleben im Vergleich zur Standardtherapie mit von 9,6 Monaten auf 14,7 Monate und die Remissionsrate von 13% auf 48% signifikant verbessert werden. Dabei profitierten Patienten aller genetischen Subgruppen. [87] Unsere Kombinationsversuche aus AZD 4320 und DAC zeigten in allen Zelllinien synergistische Effekte, besonders stark ausgeprägt bei den AML-Zelllinien MOLM-13/14 mit monoblastärem Ursprung. In weiterführenden klinischen Studien muss evaluiert werden, ob AZD 4320 in Kombination mit Decitabin oder einer anderen hypomethylierenden Substanz der Venetoclax-Kombination überlegen ist.

Der zweite getestete small-molecule-Inhibitor AZD 5991 wirkt als MCL-1-Inhibitor. MCL-1 ist ein weiterer anti-apoptotischer Vertreter der BCL-2-Familie, der komplexer als BCL-2 über verschiedene Signalwege reguliert wird. [52] Ähnlich wie bei Venetoclax bzw. AZD 4320 binden spezifische proapoptotische BH-3-Domänen das MCL-1-Protein, führen so zu seiner Inaktivierung und zur Apoptose-Induktion. Die HL-60-Zellen wiesen die geringste Affinität zu AZD 5991 auf und eine Abnahme der Proliferationsrate bzw. vitaler Zellen war um maximal 20 Prozent möglich. Bei allen anderen Zelllinien konnte eine ausgeprägte dosisabhängige Reduktion vitaler Zellen und Proliferationsinhibition in-vitro induziert werden. Höchst-sensitiv reagierten erneut MOLM-13-Zellen. Interessanterweise konnte ebenfalls bei allen Zelllinien in Kombination mit Decitabin eine synergistische Interaktion erzielt werden. Dieser Synergismus ist bisher nicht vorbeschrieben. Bei dosis-limitierenden unerwünschten

Arzneimittelnebenwirkungen der Einzel-Inhibitoren ließe sich die Konzentration der Inhibitoren durch Kombination mit Decitabin effektiv minimieren. Darüber hinaus könnte über den Nutzen einer möglichen Dreifachkombination aus BCL-2-Inhibitor, MCL-1-Inhibitor und Decitabin spekuliert werden, da durch MCL-1-Inhibition vormals Venetoclax-resistente Zellen wieder auf die BCL-2-Inhibition ansprechen. [50] Auffallend in unseren Ergebnissen war außerdem, dass MOLM-13 und MOLM-14 unterschiedlich-sensitiv auf den BCL-2/-XL und MCL-1-Inhibitor ansprachen. MOLM-13 und MOLM-14 sind Zellklone, die beide aus dem peripheren Blut eines 20-jährigen Patienten mit sekundärer AML aus MDS (FAB M5a) entstammen. [88] Somit wären primär identische Sensitivitätsniveaus anzunehmen. Eine mögliche Erklärung ist anhand verschiedener Cluster-of-differentiation-Expressionsmuster zu finden. MOLM-13-Zellen exprimieren kein CD13 und CD14, sind aber CD34 positiv. Bei MOLM-14 verhält es sich genau umgekehrt. Katharina et al. konnten in ihren Versuchen zeigen, dass CD34+-Zellen besser auf Venetoclax ansprechen. [89] Eine höhere Sensitivität wäre bei den hier verwendeten „Venetoclax-ähnlichen“ Inhibitoren denkbar.

CDK-9 gehört im Gegensatz zu BCL-2, BCL-XL und MCL-1 nicht direkt zur BCL-Proteinfamilie und verfügt - trotz seines Namens – über keine direkte Rolle bei der Zellzyklusregulation. Vielmehr formiert sich CDK-9 durch Bindung an Cyclin T1 zum Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb und reguliert die nicht-ribosomale Transkription und mRNA-Reifung. [90] Das MCL-1-Gen wird stark durch P-TEFb reguliert. [65] [63] CDK-9 wird somit als indirekter MCL-1-Inhibitor auf genomischer Ebene evaluiert. Unter den getesteten Inhibitoren zeigte der CDK-9-Inhibitor AZD 4573 die höchste AML-Affinität. Bereits unter geringen nanomolaren Konzentrationen war bei allen Zelllinien eine konzentrationsabhängige Reduktion der Proliferationsrate um mindestens 80 Prozent und eine Reduktion vitaler Leukämie-Zellen von mindestens 90 Prozent erzielt worden. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang zu einer 2020 publizierten Arbeit von Cidado et al., die AZD 4573 als hoch-potenten und stark-apoptotisch-wirkenden Inhibitor bei hämatologischen Neoplasien beschreibt. In ihren Untersuchungen lag der Fokus unter anderem auf Ermittlung der Caspase-Aktivität in OCI AML3-Zellen und anderen in dieser Arbeit nicht-getesteten Leukämie-Zelllinien. [85] Die stärkste Apoptoseinduktion konnte in unseren Untersuchungen wiederholt bei den MOLM-13 und MOLM-14-Zellen

monoblastären Ursprungs erzielt werden. Ursächlich dafür kann die Rolle von CDK-9 bei der monozytären Differenzierung diskutiert werden und, dass CDK-9 zur Apoptoseresistenz von Monozyten beiträgt. [90]

Im Gegensatz zu AZD 4320 und AZD 5991 wirkte der CDK-9-Inhibitor in Kombination mit Decitabin nur gering synergistisch. Weshalb, bleibt unklar und benötigt weiterführende Grundlagenforschung. In allen Apoptose-Ansätzen konnten falsch-positive Ergebnisse systematisch ausgeschlossen werden. Die verwendeten drei Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und in jedem Ansatz eine DMSO-Kontrolle mitgeführt, die sich in keinem Versuch signifikant von der unbehandelten Probe unterschied.

In den ex-vivo-Untersuchungen erwiesen sich alle getesteten Substanzen als potente Inhibitoren in leukämischen AML-Blasten. Unter Behandlung mit dem CDK-9-Inhibitor reagierten die Patientenzellen am sensitivsten. Vergleichende Untersuchungen mit gesunden Donor-Leukozyten könnten unsere Untersuchungen sinnvoll ergänzen.

AZD 4320 hemmt neben BCL-2 auch die BCL-X<sub>L</sub>-Unterkomponente, welche essentiell für das Überleben von Thrombozyten ist. Der kombinierte BCL-2/X<sub>L</sub>-/Bw-Inhibitors Navitoclax verpasste aufgrund durch diesen Pathomechanismus verursachte, dosislimitierende Thrombozytopenien den Durchbruch zur klinischen Anwendung. Für den Therapie-Erfolg von AZD 4320 wäre die Vermeidung einer beschränkten Anwendung durch zu starke Thrombozytopenien entscheidend. Die Forschergruppe um Balachander et al. konnte demonstrieren, dass AZD 4320 nur eine temporäre Thrombozytopenie verursacht, die innerhalb von wenigen Tagen rückläufig und nicht dosislimitierend ist. [45] Der genaue Mechanismus ist aber bisher unklar.

Im Juni letzten Jahres wurde eine Phase-I-Studie für AZD 4320 (BCL-2-/X<sub>L</sub>-Inhibitor) abgeschlossen (NCT04214093). Eine weitere Phase-I/II-Studie ist bis 2024 unter der Nummer NCT04214093 geplant. Ergebnisse sind bis dato nicht publiziert worden. AZD 5991 (MCL-1-Inhibitor) wird bereits in mehreren Studien in den USA klinisch an der AML unter der NCT-Nummer NCT03218683 getestet. Für die AZD 5991-Monotherapie, die sich momentan in Phase I befindet, wurden bzw. werden Rezidiv-/refraktäre CLL-, AML-/MDS- und multiple Myelom-Patienten inkludiert. Zusätzlich erfolgt die Testung der Kombinationstherapie von



AZD 5991 und Venetoclax an AML-Patienten, aktuell in Phase II. AZD 4573 (CDK-9-Inhibitor) wird bisher nur in Kombination mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Acalabrutinib beim Diffus-großzelligen B-Zell-Lymphom, nicht aber an der AML klinisch getestet (NCT04630756).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zusätzlich eine Sensitivität aller drei Inhibitoren in verschiedenen in-vitro-ALL-Modellen demonstriert werden. Ex-vivo käme nur der Einsatz des BCL-2/XL-Inhibitors infrage. Nur bei diesem besteht ein kleines therapeutisches Fenster. Die zwei anderen Inhibitoren wirken stärker toxisch auf physiologische mononukleäre Zellen, als auf die ALL-Blasten. Methodisch ist kritisch zu beleuchten, dass aufgrund der niedrigeren Fallzahlen der ALL in unseren Versuchen zum Hauptteil mit aufgetauten ALL-Blasten gearbeitet wurde. Unsere präklinischen Daten bieten eine Grundlage für die weiterführende klinische Testung des BCL-2/XL-Inhibitors, insbesondere bei Therapie-refraktären-ALL-Patienten.

Selbstverständlich ist zu berücksichtigen, dass unsere Experimente rein präklinischen Wert besitzen und nicht eins-zu-eins auf den menschlichen Organismus übertragbar sind. Zukünftige klinische Arzneimittelstudien müssen die Verträglichkeit, pharmakokinetische Effekte, unerwünschte Nebenwirkungen und die Überlegenheit bezüglich bereits etablierter Standardtherapien, auch gegenüber Venetoclax in Kombination mit hypomethylierenden Substanzen bezogen auf die AML, in der Leukämiebehandlung in Erfahrung bringen, um den Stellenwert der Inhibitoren klar einordnen zu können. Des Weiteren werden Biomarker bzw. prädiktive Faktoren benötigt werden, die das Ansprechen auf BCL-2-Inhibitoren vorauszusagen vermögen. Auch die Analyse des Ansprechens genetischer Subgruppe müsste genauer evaluiert werden. Nur so wird in Zukunft im Rahmen der personalisierten Medizin das bestmögliche, individuelle Outcome in der AML-/(ggfs ALL-)-Therapie zu erreichen sein.

Zusammenfassend konnten wir in der vorliegenden Arbeit durch unsere präklinischen Experimente ein vielversprechendes antileukämisches Potential der drei getesteten BCL-2-gerichteten Inhibitoren aufzeigen. Kombinationsstrategien mit hypomethylierenden Agentien könnten die Potenz weiter erhöhen. Das Sensitivitätsprofil schwankt allerdings deutlich in den untersuchten Modellen und ex-vivo-Blasten – und welche spezifischen Patientenkohorten von diesen neuen Therapeutika profitieren könnten, muss in weiterführenden Untersuchungen noch definiert werden. Diese Arbeit bildet die Grundlage für die weitere klinische Entwicklung dieser Substanzen.

## 5. Zusammenfassung

Bis heute existiert für die AML keine zufriedenstellende kurative medikamentöse Therapie. Insbesondere bei älteren Erwachsenen liegen die Chancen auf Langzeitremissionen unter zehn Prozent. Spätestens durch die EMA-Zulassung von Venetoclax in Kombination mit einer hypomethylierenden Substanz und die Aufnahme in die Behandlungsleitlinie für unfitte Patienten im Jahr 2021 erwies sich die Hemmung des anti-apoptotischen Proteins BCL-2 als effektive Strategie. An präklinischen AML-Modellen testeten wir drei neue, selektive Inhibitoren, die (in-)direkt Proteine der BCL-2-Familie hemmen: den dualen Bcl-2/XL-Inhibitor AZD 4320, den MCL-1-Inhibitor AZD 5991 und den CDK-9-Inhibitor AZD 4573 als indirekten MCL-1-Inhibitor.

An vier AML-Zelllinien (MOLM-13, MOLM-14, OCI AML3 und HL-60) und PBMCs aus Heparin-Blut-/Knochenmark von 11 neu-diagnostizierten AML-Patienten wurden mit den Inhibitoren, sowie in Kombination mit Decitabin als hypomethylierende Substanz behandelt. Die relative Apoptoserate wurde mittels Annexin-PI-Assays am FacsCalibur bestimmt (n=3), DMSO diente als Kontrolle. Die Zellviabilität/-proliferation unter Behandlung mit den Inhibitoren wurde XTT-basiert gemessen (n=6). Die PBMCs der Patienten wurden nach FICOLL-Protokoll aus Heparin-Blut isoliert. Alle drei Inhibitoren induzieren konzentrationsabhängig Apoptose ( $p < 0,001$ ) und hemmen Zellviabilität/-proliferation ( $p < 0,001$ ) an den getesteten Zellmodellen. Durch Kombination mit Decitabin ergeben sich bei den AML-Zelllinien starke synergistische Effekte bei allen Inhibitoren, am stärksten ausgeprägt beim BCL-2-/XL-Inhibitor AZD 4320 und MCL-1-Inhibitor AZD 5991 (Steigerung Apoptoserate  $\emptyset +20\%$ , Verringerung IC50 um  $\emptyset -60,59\%$ ). AML-Patientenblasten zeigen unter Behandlung mit allen Inhibitoren stark apoptotische Effekte, am sensitivsten unter dem CDK-9-Inhibitor AZD 4573. Die vorliegende Arbeit bietet eine Rationale für die klinische Testung aller drei Inhibitoren an Patienten mit AML.

Als Translation und für eine mögliche zukünftige Anwendung konnte zusätzlich eine Sensitivität aller Inhibitoren in verschiedenen in-vitro ALL-Modellen demonstriert werden. Ex-vivo zeigten v.a. der BCL-2/XL-Inhibitor und MCL-1-Inhibitor gute apoptotische Effekte.

## 6. Literaturverzeichnis

1. K. Possinger, A.C.R., J. Eucker (Hrsg.), *Klinikleitfaden Hämatologie Onkologie*. 2018: Elsevier. 595.
2. *Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut: Datenbankabfrage mit Schätzung der Inzidenz, Prävalenz und des Überlebens von Krebs in Deutschland auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten*. 2016.
3. Kraywinkel, K. and C. Spix, *Epidemiologie akuter Leukämien in Deutschland*. *Der Onkologe*, 2017. **23**(7): p. 499-503.
4. Deschler, B. and M. Lübbert, *Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology*. 2006. **107**(9): p. 2099-2107.
5. Ichimaru, M., T. Ishimaru, and J.L. Belsky, *Incidence of Leukemia in Atomic Bomb Survivors Belonging to a Fixed Cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950-71: Radiation dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia*. *Journal of Radiation Research*, 1978. **19**(3): p. 262-282.
6. Fircanis, S., et al., *The relation between cigarette smoking and risk of acute myeloid leukemia: An updated meta-analysis of epidemiological studies*. 2014. **89**(8): p. E125-E132.
7. Kayser, S., et al., *The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML*. *Blood*, 2011. **117**(7): p. 2137-2145.
8. Weinberg, O.K., et al., *Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system*. *Blood*, 2009. **113**(9): p. 1906-1908.
9. Herold, G., *Innere Medizin*. 2018: Verlag Arzt + Information. 1002.
10. *Genomic Landscapes and Clonality of De Novo AML*. 2013. **369**(15): p. 1472-1473.
11. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. *Nature*, 2009. **458**(7239): p. 719-724.
12. Papaemmanuil, E., et al., *Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia*. 2016. **374**(23): p. 2209-2221.
13. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. *Blood*, 2016. **127**(20): p. 2391-2405.
14. Tate, J.G., et al., *COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*. *Nucleic Acids Research*, 2019. **47**(D1): p. D941-D947.
15. Gilliland, D.G. and J.D. Griffin, *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia*. *Blood*, 2002. **100**(5): p. 1532-1542.
16. Grove, C.S. and G.S. Vassiliou, *Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? Disease models & mechanisms*, 2014. **7**(8): p. 941-951.
17. Rai, K., et al., *Treatment of Acute Myelocytic Leukemia: A Study by Cancer and Leukemia Group B*. *Blood*, 1982. **58**: p. 1203-12.
18. Krauss, A.C., et al., *FDA Approval Summary: (Daunorubicin and Cytarabine) Liposome for Injection for the Treatment of Adults with High-Risk Acute Myeloid Leukemia*. 2019. **25**(9): p. 2685-2690.
19. Lim, W.-S., et al., *Leukemia-selective uptake and cytotoxicity of CPX-351, a synergistic fixed-ratio cytarabine:daunorubicin formulation, in bone marrow xenografts*. *Leukemia Research*, 2010. **34**(9): p. 1214-1223.
20. Levis, M., *Midostaurin approved for FLT3-mutated AML*. *Blood*, 2017. **129**(26): p. 3403-3406.
21. Lambert, J., et al., *Gemtuzumab ozogamicin for <em>de novo</em> acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial*. 2019. **104**(1): p. 113-119.

22. Döhner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*. Blood, 2017. **129**(4): p. 424-447.
23. Cassileth, P., et al., *Varying intensity of postremission therapy in acute myeloid leukemia*. Blood, 1992. **79**(8): p. 1924-1930.
24. Dombret, H., et al., *International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts*. Blood, 2015. **126**(3): p. 291-299.
25. Kantarjian, H.M., et al., *Multicenter, Randomized, Open-Label, Phase III Trial of Decitabine Versus Patient Choice, With Physician Advice, of Either Supportive Care or Low-Dose Cytarabine for the Treatment of Older Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia*. Journal of Clinical Oncology, 2012. **30**(21): p. 2670-2677.
26. Stein, E.M., et al., *Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia*. Blood, 2017. **130**(6): p. 722-731.
27. Cortes, J.E., et al., *Glasdegib in combination with cytarabine and daunorubicin in patients with AML or high-risk MDS: Phase 2 study results*. American Journal of Hematology, 2018. **93**(11): p. 1301-1310.
28. Nasr, R., et al., *Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation*. Nature Medicine, 2008. **14**(12): p. 1333-1342.
29. Ding, L., et al., *Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing*. Nature, 2012. **481**(7382): p. 506-510.
30. Brinkmann, K. and H. Kashkar, *Targeting the mitochondrial apoptotic pathway: a preferred approach in hematologic malignancies?* Cell Death & Disease, 2014. **5**(3): p. e1098-e1098.
31. Valentin, R., S. Grabow, and M.S. Davids, *The rise of apoptosis: targeting apoptosis in hematologic malignancies*. Blood, 2018. **132**(12): p. 1248-1264.
32. Hockenbery, D., et al., *Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death*. Nature, 1990. **348**(6299): p. 334-6.
33. Potter, D.S. and A. Letai, *To Prime, or Not to Prime: That Is the Question*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2016. **81**: p. 131-140.
34. Gaulard, P., et al., *Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma*. The American journal of pathology, 1992. **140**(5): p. 1089-1095.
35. Narayan, S., et al., *Expression of apoptosis regulators Bcl-2 and Bax in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Hematology, 2007. **12**(1): p. 39-43.
36. Stam, R.W., et al., *Association of high-level MCL-1 expression with in vitro and in vivo prednisone resistance in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2010. **115**(5): p. 1018-1025.
37. Konopleva, M. and A. Letai, *BCL-2 inhibition in AML: an unexpected bonus?* Blood, 2018. **132**(10): p. 1007-1012.
38. Marcucci, G., et al., *Phase 1 and pharmacodynamic studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia*. Blood, 2003. **101**(2): p. 425-432.
39. Certo, M., et al., *Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members*. Cancer Cell, 2006. **9**(5): p. 351-365.
40. Del Poeta, G., et al., *Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML): Presented in part at the 42nd annual meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, CA, December 1-5, 2000*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2125-2131.
41. Chonghaile, T.N., et al., *Pretreatment Mitochondrial Priming Correlates with Clinical Response to Cytotoxic Chemotherapy*. 2011. **334**(6059): p. 1129-1133.
42. Oltersdorf, T., et al., *An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 677-681.

43. Afreen, S., et al., *BCL-XL expression is essential for human erythropoiesis and engraftment of hematopoietic stem cells*. *Cell Death & Disease*, 2020. **11**(1): p. 8.
44. Schoenwaelder, S.M., et al., *Bcl-xL–inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopenia that undermines the hemostatic function of platelets*. *Blood*, 2011. **118**(6): p. 1663-1674.
45. Balachander, S.B., et al., *AZD4320, A Dual Inhibitor of Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub>, Induces Tumor Regression in Hematologic Cancer Models without Dose-limiting Thrombocytopenia*. 2020. **26**(24): p. 6535-6549.
46. Davids, Matthew S. and A. Letai, *ABT-199: Taking Dead Aim at BCL-2*. *Cancer Cell*, 2013. **23**(2): p. 139-141.
47. Roberts, A.W., et al., *Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia*. *N Engl J Med*, 2016. **374**(4): p. 311-22.
48. Pan, R., et al., *Selective BCL-2 Inhibition by ABT-199 Causes On-Target Cell Death in Acute Myeloid Leukemia*. 2014. **4**(3): p. 362-375.
49. Konopleva, M., et al., *Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia*. 2016. **6**(10): p. 1106-1117.
50. Carter, B.Z., et al., *Co-Targeting MCL-1 and BCL-2 Is Highly Synergistic in BH3 Mimetic- and Venetoclax/Hypomethylating Agent-Resistant and TP53 Mutated AML*. *Blood*, 2020. **136**(Supplement 1): p. 7-7.
51. Michels, J., P.W.M. Johnson, and G. Packham, *Mcl-1*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005. **37**(2): p. 267-271.
52. Thomas, L.W., C. Lam, and S.W. Edwards, *Mcl-1; the molecular regulation of protein function*. *FEBS Letters*, 2010. **584**(14): p. 2981-2989.
53. Zack, T.I., et al., *Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration*. *Nature Genetics*, 2013. **45**(10): p. 1134-1140.
54. Glaser, S.P., et al., *Anti-apoptotic Mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia*. *Genes & development*, 2012. **26**(2): p. 120-125.
55. Wertz, I.E., et al., *Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7*. *Nature*, 2011. **471**(7336): p. 110-114.
56. Wei, S.-H., et al., *Inducing apoptosis and enhancing chemosensitivity to Gemcitabine via RNA interference targeting Mcl-1 gene in pancreatic carcinoma cell*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2008. **62**(6): p. 1055-1064.
57. Choudhary, G.S., et al., *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*, 2015. **6**(1): p. e1593-e1593.
58. Niu, X., et al., *Binding of Released Bim to Mcl-1 is a Mechanism of Intrinsic Resistance to ABT-199 which can be Overcome by Combination with Daunorubicin or Cytarabine in AML Cells*. 2016. **22**(17): p. 4440-4451.
59. Doi, K., et al., *Maritoclax induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells with elevated Mcl-1 expression*. *Cancer Biology & Therapy*, 2014. **15**(8): p. 1077-1086.
60. *Study of AZD5991 Alone or in Combination With Venetoclax in Relapsed or Refractory Haematologic Malignancies*.; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03218683>.
61. Falco, G.D. and A. Giordano, *CDK9: From Basal Transcription to Cancer and AIDS*. *Cancer Biology & Therapy*, 2002. **1**(4): p. 341-346.
62. Lin, X., et al., *P-TEFb containing cyclin K and Cdk9 can activate transcription via RNA*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(19): p. 16873-8.
63. Romano, G. and A. Giordano, *Role of the cyclin-dependent kinase 9-related pathway in mammalian gene expression and human diseases*. *Cell Cycle*, 2008. **7**(23): p. 3664-8.
64. Gojo, I., et al., *Clinical and laboratory studies of the novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (SCH 727965) in acute leukemias*. 2013. **72**(4): p. 897-908.

65. *Study to Assess Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Antitumor Activity of AZD4573 in Relapsed/Refractory Haematological Malignancies*. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03263637>.
66. Issa, J.-P., *Decitabine*. 2003. **15**(6): p. 446-451.
67. Sato, T., J.J. Issa, and P. Kropf, *DNA Hypomethylating Drugs in Cancer Therapy*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017. **7**(5).
68. Frey, N.V. and S.M. Luger, *How I treat adults with relapsed or refractory Philadelphia chromosome–negative acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2015. **126**(5): p. 589-596.
69. Erdmann F, K.P., Grabow D, Spix C, *German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2019 (1980-2018)*. 2020.
70. Wartenberg, D., F.D. Groves, and A.S. Adelman, *Acute Lymphoblastic Leukemia: Epidemiology and Etiology*, in *Acute Leukemias*, E.H. Estey, S.H. Faderl, and H.M. Kantarjian, Editors. 2008, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 77-93.
71. Hoelzer, D., et al., *Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up* &#x2020. Annals of Oncology, 2016. **27**: p. v69-v82.
72. Martinelli, G., et al., *Complete Hematologic and Molecular Response in Adult Patients With Relapsed/Refractory Philadelphia Chromosome–Positive B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Following Treatment With Blinatumomab: Results From a Phase II, Single-Arm, Multicenter Study*. 2017. **35**(16): p. 1795-1802.
73. Hoelzer, D., et al., *Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*†. Annals of Oncology, 2016. **27**(suppl\_5): p. v69-v82.
74. Chalandon, Y., et al., *Randomized study of reduced-intensity chemotherapy combined with imatinib in adults with Ph-positive acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2015. **125**(24): p. 3711-3719.
75. DiNardo, C.D., et al., *Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2019. **133**(1): p. 7-17.
76. Matsuo, Y., et al., *Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23)*. Leukemia, 1997. **11**(9): p. 1469-1477.
77. Quentmeier, H., et al., *Cell line OCI/AML3 bears exon-12 NPM gene mutation-A and cytoplasmic expression of nucleophosmin*. Leukemia, 2005. **19**(10): p. 1760-1767.
78. Schneider, U., H.-U. Schwenk, and G. Bornkamm, *Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma*. 1977. **19**(5): p. 621-626.
79. Scudiero, D.A., et al., *Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines*. 1988. **48**(17): p. 4827-4833.
80. Büscher, M., *Flow Cytometry Instrumentation – An Overview*. 2019. **87**(1): p. e52.
81. Weiß, C., *Basiswissen Medizinische Statistik, 5. überarbeitete Auflage*. 2010: Springer. 354.
82. Gökbüget, N., *Treatment of Older Patients with Acute Lymphoblastic Leukaemia*. Drugs & Aging, 2018. **35**(1): p. 11-26.
83. Kantarjian, H., et al., *Intensive chemotherapy does not benefit most older patients (age 70 years or older) with acute myeloid leukemia*. Blood, 2010. **116**(22): p. 4422-4429.
84. Christoph Röllig, D.W.B., Jan Braess, Richard Greil, Michael Heuser, Markus G. Manz, Jakob Passweg, Dirk Reinhardt, Richard F. Schlenk. *Akute myeloische Leukämie (AML) - Leitlinie Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen*. 2021 [cited 2021].

85. Cidado, J., et al., *AZD4573 Is a Highly Selective CDK9 Inhibitor That Suppresses MCL-1 and Induces Apoptosis in Hematologic Cancer Cells*. 2020. **26**(4): p. 922-934.
86. Houshmand, M., et al., *Targeting Chronic Myeloid Leukemia Stem/Progenitor Cells Using Venetoclax-Loaded Immunoliposome*. *Cancers*, 2021. **13**(6): p. 1311.
87. DiNardo, C.D., et al., *Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia*. *New England Journal of Medicine*, 2020. **383**(7): p. 617-629.
88. Matsuo, Y., et al., *Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23)*. *Leukemia*, 1997. **11**(9): p. 1469-77.
89. Katharina, M., et al., *CD34+ acute myeloid leukemia cells with low levels of reactive oxygen species show increased expression of stemness genes and can be targeted by the BCL2 inhibitor venetoclax*. *Haematologica*, 2020. **105**(8): p. e399-e403.
90. De Falco, G. and A. Giordano, *CDK9: from basal transcription to cancer and AIDS*. *Cancer Biol Ther*, 2002. **1**(4): p. 342-7.



## 7. Eigenständigkeitserklärung

Die Dissertationsarbeit wurde im Labor für experimentelle Hämatologie & Onkologie der Medizinischen Klinik II mit Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie & Rheumatologie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Herrn PD Dr. med. Marcus M. Schittenhelm angefertigt. Konzipiert wurde die Arbeit von und mit Frau PD Dr. med. Kerstin M. Kampa-Schittenhelm.

Alle Versuche wurden eigenständig von mir durchgeführt und eigenständig statistisch ausgewertet.

Mit Herrn Dr. med. Blumenstock vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie, Silcherstraße 5, 72076 Tübingen wurde besprochen, welche statistischen Tests am geeignetsten für die Versuchskonzeption sind und es wurden die Grundlagen der Statistiksoftware JMP 14 demonstriert.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als, die von mir angegebenen Quellen, verwendet zu haben.

Tübingen, den 09.03.2022, \_\_\_\_\_

## 8. Veröffentlichungen

1. Evaluation of a novel dual BCL-2/XL inhibitor (AZD04320) in acute leukemia models., *Rebecca Froehlich, Melanie Wiecken, Lothar Kanz, Marcus M Schittenhelm, Kerstin M Kampa-Schittenhelm*, Posterpräsentation DGHO-Kongress, 11.10.2019, Berlin
2. Evaluation of a novel dual BCL-2/XL inhibitor (AZD04320) in acute leukemia models., *Rebecca Froehlich, Melanie Wiecken, Lothar Kanz, Marcus M Schittenhelm, Kerstin M Kampa-Schittenhelm*, Posterpräsentation Forschungskolloquium 2020 der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen, 24.01.2020, Tübingen
3. ASPP2k, a Dominant-Negative Splicing Variant of the Apoptosis-Stimulating Protein of p53-2 (ASPP2), Modulates Treatment Response Towards BCL-Signaling Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia, *Marcus M. Schittenhelm, Vasileia Tsintari, Rebecca Fröhlich\* and Kerstin Maria Kampa-Schittenhelm*, Vortrag und Poster beim American Society of Hematology (ASH) Congress 2021

## 9. Danksagung

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei:

- Frau PD Dr. Kampa-Schittenhelm und Herrn PD Dr. Marcus Schittenhelm für die Überlassung des Themas, die stets sehr gute Betreuung meiner Arbeit und Ihre Unterstützung, egal ob für die Dissertation selbst, DGHO, oder Stipendien.
- dem gesamten Laborteam unserer Arbeitsgruppe für die gemeinsame Zeit: Sebastian Braun, Büke Celikdemir, Sara Dreher, Lara Häußler., Ingmar Rieger, Valia Tsintari, und Melanie Wiecken
- Prof. Dr. Kanz und Prof Dr. Lengerke für die Möglichkeit in Ihrer Abteilung promovieren zu können. Vielen Dank auch an Prof. Dr. Lengerke für die Möglichkeit Teil Ihres Teams zu sein!
- dem IZKF des UKT Tübingen, ohne das die Dissertation so nicht hätte durchgeführt werden können
- Herrn Dr. Blumenstock für die statistische Beratung & Frau Braun von der IT-Abteilung der Medizinischen Klinik
- der MTA-(L-)Schule Stuttgart am Katharinenhospital und insbesondere Herrn Dr. Schleicher, Frau Dr. Körner, sowie Frau Hanold, die mein Interesse für die Hämatologie geweckt haben
- dem Cusanuswerk für die Unterstützung und den interdisziplinären Austausch
- meinen Kommilitonen von der SEG-MED eG
- all meinen Freunden/-innen hier in Tübingen - ein besonderer Dank gilt Philippa, Caro, Nadine, Lena, Nura, Jessi und Jacky. Was wäre die Studienzeit ohne euch gewesen!
- meinen Eltern Petra Fröhlich & Dr. med. Gregor Fröhlich, die mich über allen Maßen für das Studium motiviert und mich stets in allen Belangen unterstützt haben
- meinem kleinen(-großen) Bruder Julian, der meine Daten hätte bestimmt besser statistisch auswerten können als ich! Ich bin sehr stolz auf dich!
- meinen besten Großeltern Ursula & Max Böser
- und last but not least: ein großes Danke an Mareen!

## **10. Lebenslauf**

Auf die Veröffentlichung des Lebenslaufes wurde aus persönlichen Gründen verzichtet.