

Evaluation neuer Therapieansätze für Myeloische Leukämie bei Kindern mit Down-Syndrom

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von David Agha-Mir-Salim geb. Samulowski

Betreuerinnen: Prof. Dr. med. Jan-Henning Klusmann
Priv.-Doz. Dr. med. Jessica Höll

Gutachterin/Gutachter:

Prof. Simone Hettmer, Halle (Saale)
Prof. Denis Schewe, Dresden

Datum der Verteidigung: 11.11.2025

Referat

Ziele: Das Risiko eine Leukämie zu entwickeln ist für Kinder mit Down-Syndrom besonders hoch. In der Therapie gilt es, eine Balance zwischen nötiger Wirksamkeit und erhöhter Toxizität in dieser Patientengruppe zu finden. Der Nutzen, den neue Therapieoptionen in dieser Patientengruppe bergen könnten, ist offenkundig enorm. Die Dysregulation anti-apoptotischer Mitglieder der BCL-2-Familie ist eine bekannte Überlebensstrategie maligner Erkrankungen, die Gruppe der BH3-Inhibitoren hat hier präklinisch und klinisch in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Wir untersuchten hier das Potenzial des BCL-2 / -XL-Inhibitors Navitoclax (ABT-263) für die Behandlung der pädiatrischen AML. Dabei evaluierten wir die Untergruppen-spezifische anti-leukämische und pro-apoptotische Wirkung in präklinischen Modellen bei Down-Syndrom assoziierter akuter myeloischer Leukämie (ML-DS) und akuter myeloischer Leukämie mit *KMT2A*-Aberration (*KMT2Ar*).

Methoden: Vier verschiedene AML-Zelllinien sowie leukämische Blasten von acht pädiatrischen AML-Patienten wurden *in vitro* ansteigenden Konzentrationen von ABT-263 ausgesetzt. Die Zielproteine BCL-2 und BCL-XL wurden durch Western Blot Assays nachgewiesen. Mittels *small hairpin RNA* (shRNA) wurde die Expression von BCL-2 oder BCL-XL in Zelllinien und PDX-Zellen unterdrückt und das Wachstumsverhalten beobachtet. Ein BH3-Profilung beleuchtete die apoptotischen Interaktionen. Anschließend wurde ein Xenotransplantat-Mausmodell (PDX) verwendet, um das Ansprechen auf die Behandlung mit ABT-263 *in vivo* zu evaluieren. Nach einer 21-tägigen Behandlung erfolgten bei einer Kohorte Endpunkt Analysen mittels Durchflusszytometrie, mRNA-Sequenzierung, sowie Vermessung der Milz. Eine weitere Kohorte diente der Überlebensanalyse.

Ergebnisse: PDX Blasten und Zelllinien mit *KMT2A*-Aberration zeigten eine deutliche Verminderung des Wachstums mit EC_{50} -Werten von 93 nM. Dabei zeigte sich bei einer EC_{50} von 1,2 μ M in CD34⁺ Zellen die potenzielle therapeutische Bandbreite. BH3-Profilung, Western Blot und shRNA-Knockdown Experimente zeigten ein variables Expressionsprofil und eine vitale Abhängigkeit von der BCL-2 Proteinfamilie. Nachfolgende *in vivo* Experimente zeigten ein gutes Ansprechen und einen Überlebensvorteil bei *KMT2A*-Aberration, während ML-DS refraktär gegenüber der Therapie mit ABT-263 war.

Fazit: Unsere Ergebnisse unterstreichen, dass ABT-263 eine vielversprechende Therapie bei pädiatrischer AML mit *KMT2A*-Aberration darstellt, wobei sich das Therapieansprechen unter anderem durch BH3 Profiling abschätzen lässt. Wir betonen die Bedeutung einer Dysregulation der Apoptose für die Proliferation von kindlicher AML und geben einen Ausblick auf bisher unerforschte therapeutische Möglichkeiten.

Agha-Mir-Salim, David: Evaluation neuer Therapieansätze für Myeloische Leukämie bei Kindern mit Down-Syndrom, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 60 Seiten, 2025

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis	
2	Tabellenverzeichnis	
3	Abkürzungsverzeichnis	
4	Einleitung	1
4.1	<i>Akute Leukämien im Kindesalter</i>	1
4.1.1	<i>Akute Myeloische Leukämie im Kindesalter</i>	2
4.2	<i>Tumor evasion strategies: Apoptose</i>	3
4.2.1	<i>Physiologie der Apoptose</i>	4
4.2.2	<i>Regulatoren der Apoptose</i>	7
4.2.3	<i>Messung der Apoptose</i>	8
4.3	<i>Therapie der AML</i>	10
4.4	<i>B-cell-lymphoma-Protein (BCL) Inhibitoren</i>	10
5	Zielstellung	14
6	Material und Methoden	15
6.1	<i>Zellkultur</i>	15
6.2	<i>Patientenzellen</i>	16
6.3	<i>Dosis-Wirkungs-Kurven-Assay und EC₅₀-Berechnung</i>	16
6.4	<i>Messung der Apoptose</i>	17
6.5	<i>Western Blots</i>	18
6.6	<i>shRNA induzierter BCL-2 / -XL-Knockdown</i>	19
6.6.1	<i>Transformation</i>	20
6.6.2	<i>Transfektion</i>	20
6.6.3	<i>Transduktion und kompetitives Knockdown</i>	21
6.7	<i>BH3-Profiling</i>	22
6.8	<i>Tierversuche</i>	23
6.9	<i>mRNA-Sequenzierung</i>	24
7	Ergebnisse	26
7.1	<i>Die in vitro Wirksamkeit von ABT-263 (Navitoclax) variiert zwischen AML-Subtypen und korreliert mit der BCL-2 Expression</i>	26
7.2	<i>Die Expression von BCL-2 und BCL-XL sichert Viabilität von AML Zellen</i>	29
7.3	<i>ABT-263 reduziert die Leukämielast und verlängert das Überleben von AMKL- und KMT2Ar-PDX transplantierten Mäusen</i>	31
7.4	<i>Die apoptotischen Eigenschaften von Zelllinien und Patientenzellen werden durch BH3-Profiling aufgedeckt – KMT2Ar zeigt ein besonderes Muster</i>	36
7.5	<i>mRNA Sequenzierungen zeigten bisher unbekannte Resistenzmuster der AML unter der Therapie mit ABT-263</i>	38
8	5. Diskussion	41
9	Zusammenfassung	48
10	Literaturverzeichnis	50
11	Thesen	60
12	Anlagen	
13	Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbstständigkeitserklärung	
14	Danksagung	

1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalwegs der Apoptose.

Abbildung 2: ABT-263 induziert eine dosisabhängige apoptotische Wirkung in Zelllinien.

Abbildung 3: Die Effektivität von ABT-263 zeigt eine Korrelation mit der BCL-2 Expression.

Abbildung 4: shRNA Knockdown von BCL-2 und BCL-XL hemmt die Proliferation von Zelllinien und Patientenzellen. Der Anteil apoptotischer Zellen wird durch ABT-263 erhöht.

Abbildung 5: Versuchsaufbau zur in vivo Testung mittels eines PDX-basierten Mausmodells

Abbildung 6: Die Gewichte der Milz nach Behandlung mit ABT-263 über 21 Tage unterscheiden sich deutlich zwischen den verschiedenen Subtypen.

Abbildung 7: ABT-263 bewirkt eine drastische Verringerung der Leukämiezellen im Blutkreislauf und Knochenmark der Versuchstiere.

Abbildung 8: Bei KMT2Ar zeigt sich ein signifikanter Überlebensvorteil.

Abbildung 9: ML-DS zeigt sich refraktär gegenüber ABT-263.

Abbildung 10: BCL-2 ist für die überwiegende Mehrheit der Zelllinien der dominante Überlebensmechanismus der Apoptose.

Abbildung 11: BCL-2 Dominanz oder Abwesenheit von Resistenzfaktoren sind therapieentscheidend für die Behandlung von PDX mit ABT-263:

Abbildung 12: mRNA Sequenzierung des Knochenmarks der Versuchsmäuse von KMT2Ar #1 und #4 enthüllt Resistenzmuster:

Abbildung 13: mRNA Sequenzierung von ML-DS #2 und #3 zeigt die Resistenzentwicklung dieser Untergruppe:

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Plasmide zur Klonierung

Tabelle 2: Zytogenetik der verwendeten Zelllinien

Tabelle 3: Zytogenetik der verwendeten Patientenzellen

3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung/-en
ALL	Akute Leukämische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMKL	Akute Megakaryoblastische Leukämie
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor – 1</i>
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the Curve</i>
BAD	<i>BCL-2 associated agonist of cell death</i>
BAK	<i>BCL-2 antagonist/ killer</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-2-A1	<i>B-cell lymphoma 2-related protein A1</i>
B-ALL	B-Zell Akute Lymphatische Leukämie
BAX	<i>BCL2 associated X, apoptosis regulator</i>
BET	<i>Bromodomain and Extra-Terminal motif</i>
BGBI	Bundesgesetzblatt
BH	<i>BCL-2 Homology</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIK	<i>BCL-2 interacting killer</i>
BIM	<i>BCL-2 interacting mediator</i>
BMF	<i>BCL-2 modifying factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CAD	<i>intranukleär lokalisierte Caspase-activated deoxyribonuclease</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
DAPI	4'6-Diamin-2-phyindol
DISC	<i>death inducing signalling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DS	Down Syndrom
EC ₅₀	<i>half maximal effective concentration</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FACS™	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein isothiocyanate

FLT3-ITD	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
FLT3-TKD	<i>FMS-like tyrosine-kinase</i>
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde, Max-Planck-Institut für Immunbiologie und Epigenetik
HRK	<i>harakiri, BCL2 interacting protein</i>
HSPC	<i>hematopoietic stem and progenitor cell</i>
HSZT	Hämatopoetischen Stammzelltransplantation
k.A.	keine Angabe
MAC	<i>mitochondrial apoptosis-induced channel</i>
MCL1	<i>induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
KMT2Ar	<i>mixed lineage leukemia</i>
ML-DS	<i>myeloid leukemia in Down Syndrome</i>
MOM	<i>mitochondrial outer membrane</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NR	<i>non-responder</i>
ns	nicht signifikant
Oligos	Oligonukleotide
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDX	<i>Patient derived Xenografts</i>
PMAIP1	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RW	rückwärts
SCLC	<i>small cell lung Carcinoma</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
SMAC	<i>second mitochondria-derived activator of caspases</i>
TAM	<i>transient abnormal hematopoiesis</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>
TierSchG	Tierschutzgesetz
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>

TP53	<i>Tumor protein 53</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
VDAC	<i>mitochondrial voltage-dependant-anion-channel</i>
VW	Vorwärts
WHO	<i>World-Health-Organization</i>
XIAP	<i>x-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

4 Einleitung

4.1 Akute Leukämien im Kindesalter

Die Diagnose einer Leukämie im Kindesalter ist für alle Beteiligten, jedoch insbesondere Eltern und Kind, eine zunächst schockierende und schwer zu begreifende Tatsache. Um die Diagnose und die damit verbundenen Implikationen fassbarer zu machen, gilt es, den Eltern eine Aussicht über die vor ihnen stehende Zeit und Therapieoptionen zu geben. Diese hängen maßgeblich von der Form der Leukämie ab. Die überwiegende Mehrheit der Leukämien im Kindesalter verlaufen akut und manifestieren sich beispielsweise durch eine B-Symptomatik, Infektanfälligkeit, Müdigkeit, Knochenschmerzen und viele weitere mögliche Symptome. Die akute lymphatische Leukämie (ALL) nimmt mit einer Inzidenz ca. 3,7 pro 100.000 Kindern pro Jahr den größten Anteil der diagnostizierten Leukämien ein. Die akute myeloische Leukämie (AML) macht im ersten Lebensjahrzehnt bis zu 15% und im zweiten Lebensjahrzehnt etwa 30% der pädiatrischen Leukämien aus (Madhusoodhan, Carroll et al. 2016) und ist mit einer Inzidenz von ca. 0,7:100.000 Menschen pro Jahr ohne Geschlechtsunterschiede deutlich seltener (Brenner and Spix 2003). Der Altersmedian liegt bei 4 Jahren und 2 Monaten, es gibt geringe Altersgipfel in den ersten 24 Lebensmonaten und um das 13. Lebensjahr (Kaatsch 2018). Kinder mit Down-Syndrom (DS) haben ein etwa 150-fach höheres Risiko für die Entstehung einer Leukämie gegenüber Kindern ohne DS und stellen somit eine besonders gefährdete Gruppe dar. (Hasle, Clemmensen et al. 2000). Trotz intensiver Forschung wurde bei kindlicher AML in den letzten 30 Jahren nur ein Gesamtüberleben von 60 bis 70 Prozent erreicht (Creutzig, Zimmermann et al. 2013, An, Fan et al. 2017, Rubnitz 2017). Die Überlebensraten bei primärer ML-DS sind mit ~ 90% 5-Jahres Ereignisfreiem Überleben deutlich besser, jedoch sind Rezidive schwer zu behandeln und haben oft eine schlechte Prognose (Sorrell, Alonzo et al. 2012, Uffmann, Rasche et al. 2017, Raghuram, Hasegawa et al. 2023). Die Charakterisierung der AML anhand der WHO-Klassifikation umfasst Morphologie, Zytogenetik, Molekulargenetik und Immunphänotypisierung. Dies dient der Identifikation von Gentranslokationen, Chromosomenaberrationen, Genmutationen und Linienzugehörigkeit.

Die Behandlungsmöglichkeiten für pädiatrische AML sind noch deutlich eingeschränkt. Die derzeitige Therapie basiert hauptsächlich auf in den 1980er Jahren entwickelten Zytostatika wie Cytarabin, Daunorubicin, Idarubicin, Mitoxantron oder Etoposid (Rubnitz 2017), welche zu dieser Zeit die Therapie revolutionierten. Vor Einführung der Kombinationstherapie mit L-Asparaginase, Daunorubicin und Cytarabin betrug die Remissionsrate nur 16 bis 25 % (Crowther, Bateman et al. 1970). Die Überlebenswahrscheinlichkeit hat seitdem drastisch zugenommen. So lag sie in den 1980er Jahren noch bei ca. 40% (Kaatsch 2018). Obwohl die Behandlungszyklen für diese Medikamente optimiert wurden, sind sie sehr intensiv und die Patienten leiden aufgrund der Toxizität der Chemotherapie an Komplikationen wie Blutungen, schweren Infektionen oder

verminderter Herzfunktion (Ebb and Weinstein 1997, Creutzig, van den Heuvel-Eibrink et al. 2012, Creutzig, Zimmermann et al. 2013). Demnach besteht ein Bedarf an neuartigen, zielgerichteten und nebenwirkungsärmeren Therapien für AML im Kindesalter.

4.1.1 Akute Myeloische Leukämie im Kindesalter

Die AML entstammt den verschiedenen Unterklassen der myeloischen Reifungslinie und deren genetischen Variationen. Jede Leukämie-Untergruppe weist einzigartige Eigenschaften auf, die das Behandlungsergebnis der Patienten beeinflussen. Die Translokation des *KMT2A* Gens (t(10;11); t(4;11)(q21;q23); t(9;11)(p22;q23); t(1;11)(q21;q23) und weitere), im Folgenden zusammenfassend *mixed lineage leukemia* (KMT2Ar) genannt, machen bis zu 50% der AML bei Säuglingen und 10 % der Fälle von AML bei älteren Kindern und Erwachsenen aus, sowie bis zu 70 % der Fälle von ALL in Säuglingen (Krivtsov and Armstrong 2007). Damit ist sie prädominant in einer Patientengruppe, welche besonders sensibel auf Nebenwirkungen der Therapie reagiert und hat insgesamt eine eher schlechte Prognose, nicht zuletzt durch ein verringertes Ansprechen auf eine konventionelle Chemotherapie. KMT2Ar besitzt sowohl myeloische, als auch lymphatische Oberflächenmarker in unterschiedlicher Ausprägung. So ist ein Wechsel der Klasse, z.B. von initial ALL zu einem AML Rezidiv möglich (Stass, Mirro et al. 1984).

Der Proteinkomplex MLL sorgt physiologisch für die Methylierung, Acetylierung und Chromatin Remodellierung verschiedener Interaktionspartner. Der Mutationsmechanismus ist weitestgehend unbekannt, eine Hypothese vermutet bei vorbehandelten Kindern DNA-Doppelstrangbrüche, z.B. durch eine vorangegangene Behandlung mit Topoisomerase Inhibitoren wie Etoposid. Dies führe zu der Bildung von Fusionsgenen und -proteinen, welche die Differenzierung der Hämatopoiese inhibieren und die klonale Vermehrung von Progenitorzellen fördern würden (Slany 2009).

Häufige, durch Translokation geformte Fusionsgene mit *KMT2A* sind *KMT2A::AFF1*, *KMT2A::MLLT3*, und *KMT2A::ENL*, welche die Fusionsproteine MLL-AF4, MLL-AF9 und MLL-ENL bilden. Das *KMT2A::AFF1* Fusionsgen führt häufig zu einer CD19+ B-ALL mit einer schlechten Prognose und einem 5-Jahres Überleben von nur 19 – 42 % (Muntean and Hess 2012). In über 85% der Fälle besteht eine Fusion des MLL-Proteins mit einem von 6 Partnerproteinen: AF4, AF9, ENL, AF10, ELL, AF6 (Meyer, Kowarz et al. 2009). Das MLL-AF9-Fusionsprotein ist in ca. 25% der pädiatrischen AML vertreten und mit einem mittleren Überleben von ~ 4 Jahren assoziiert (Muntean and Hess 2012). *KMT2A::ENL* führt sowohl zu AML als auch ALL und zeigt ebenfalls eine schlechte Prognose. Da das Ansprechen von KMT2Ar auf übliche Therapieregimes wie Prednison schlecht ist und somit das Gesamt-Outcome deutlich reduziert wird, braucht es für diese Art der Leukämie dringend neue Therapieregime (Pui, Chessells et al. 2003). Es zeigte sich jedoch bei t(4;11) eine erhöhte Konzentration von BCL-2, was auf einen möglichen Therapieansatz hoffen lässt (Robinson, Behling et al. 2008).

Die pädiatrische akute megakaryoblastische Leukämie (AMKL) kann mit oder ohne Down-Syndrom (DS) Assoziation auftreten. Nicht Down-Syndrom assoziierte AMKL (non-DS-AMKL) umfasst bis zu 15 % der pädiatrischen AML-Fälle, wird bei Erwachsenen selten diagnostiziert (~ 1 %) und hat eine schlechte Prognose (Gruber and Downing 2015). Die allogene Stammzelltransplantation bietet derzeit die beste Therapieoption für diese Patienten (Athale, Razzouk et al. 2001, Maarouf, Mahmoud et al. 2019). In Verbindung mit DS wird AMKL als myeloische Leukämie bei Down-Syndrom (ML-DS) bezeichnet. Kinder mit DS haben eine 500x höhere Wahrscheinlichkeit eine AMKL zu entwickeln als eine andere Form der Leukämie (Gruber and Downing 2015). Sie ist durch megakaryozytische und erythroide Zelloberflächenmarker gekennzeichnet und entwickelt sich in Assoziation mit einer GATA1-Mutation von transienter abnormaler Myelopoese (TAM) zu ML-DS (Langebrake, Creutzig et al. 2005, Labuhn, Perkins et al. 2019). Die GATA-1 Mutation bewirkt eine Störung in der Differenzierung von Erythrozyten und Thrombozyten und führt in Kombination mit einer Trisomie-21 zu einer TAM. Ein wichtiger Mechanismus ist die Mutation des Transkriptionsfaktors ARID3A, welcher einen Sicherheitsschritt zur Differenzierung von Megakaryoblasten darstellt. Die Kombination aus GATA1 und ARID3A Mutationen führt schließlich zu ML-DS (Alejo-Valle, Weigert et al. 2022). Nicht nur im biologischen Kontext unterscheidet sich ML-DS gegenüber non-DS-AML. ML-DS ist mit einem deutlich besseren klinischen Outcome assoziiert und weist Remissionsraten von ca. 90 % auf. Dies erklärt sich durch die erhöhte Cytarabin-Sensitivität von ML-DS Zellen, welche jedoch einher geht mit einer deutlich erhöhten therapieassoziierten Toxizität bei den betroffenen Patienten. So zeigen Kinder mit DS schon bei deutlich niedrigeren Chemotherapie-Dosen gehäuft Toxizität-bedingte Nebenwirkungen (Gamis 2005). Dies führte zu Dosis reduzierten Therapieregimen für diese Patientengruppe und bedingt die vorwiegende Therapielimitation. Es gilt bei der Therapie eine Balance zwischen der nötigen Wirksamkeit und der vertretbaren Toxizität zu finden. Auch wenn Rezidive mit ca. 6% selten sind, haben sie eine deutlich erhöhte Mortalität und sind schwer zu behandeln (Uffmann, Rasche et al. 2017).

4.2 Tumor evasion strategies: Apoptose

Die Dysregulation der Apoptose ist eine bekannte Überlebensstrategie maligner Zellen. Um die Therapieergebnisse zu optimieren und individuelle Therapiekonzepte für AML-Subtypen zu entwickeln, müssen spezifische biologische Eigenschaften gefunden werden, die gezielte Therapieansätze ermöglichen. Da die Apoptose eine Schlüsselrolle bei der Homöostase spielt, ist die Störung dieses physiologischen Regulators ein starker Treiber für eine fortschreitende maligne Transformation (Jin and El-Deiry 2005). Da der Prozess des kontrollierten Zelltods eine komplexe Abfolge von Interaktionen darstellt, gibt es viele Möglichkeiten diesen zu stören. Eine Schlüsselrolle nimmt hier die *B-cell-lymphoma* (BCL) Protein Familie ein. Die onkogenen

Eigenschaften von Mitgliedern dieser Familie wurden bereits bei zahlreichen malignen Erkrankungen wie Plattenepithelkarzinomen (Ow, Fulcher et al. 2019), kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC) (Gandhi, Camidge et al. 2011), hepatozellulären Karzinomen (Tutusaus, Stefanovic et al. 2018) oder chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) (Roberts, Seymour et al. 2012) nachgewiesen. Durch die Bindung von pro-apoptotischen Peptiden verhindern sie die Einleitung der Apoptose und sorgen für das Überleben der Zelle. Fallen jedoch wichtige Kontrollschritte dieser Proteine aus, oder nimmt die Aktivität zum Beispiel durch Überexpression drastisch zu, verhindert die BCL-Familie die Apoptose unkontrolliert proliferierender Zellen und fördert so Krebsleiden.

4.2.1 Physiologie der Apoptose

Die Apoptose wird durch ein Gleichgewicht von pro- und anti-apoptotischen Signalen reguliert, die durch Zytokine, physikalische oder chemische Reize vermittelt werden. Proteine der anti-apoptotischen BCL-2-Familie (BCL-2, BCL-XL, BCL-w, MCL-1, A1) können das Überleben der Zelle sicherstellen, indem sie Mitglieder der pro-apoptotischen BH3-Familie (BAK, BAX) binden. Freie BH3 Peptide bewirken wiederum eine Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und so die Freisetzung von Cytochrom c, welches einen Mechanismus in Gang setzt, der über die Einleitung der Caspase-Kaskade schlussendlich zum Zelltod führt (Czabotar, Lessene et al. 2014). Die Apoptose wurde erstmals anhand des Nematoden *C. elegans* genauer untersucht (Driscoll 1992). Sie stellt einen Schritt dar, ohne den komplexe Organismen nicht existieren könnten. So wäre die Keimbahnreifung, Selektion von Immunzellen, Kontrolle der Größe, Morphologie und Funktion von Geweben und Organen, sowie viele weitere Prozesse ohne sie nicht möglich. Initiiert wird der Prozess auf zwei verschiedenen Wegen: Den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg (Abbildung 1). Der extrinsische Signalweg wird durch Bindung von Liganden (z.B. *tumor necrosis factor* (TNF) durch aktivierte Makrophagen) an den Rezeptoren der TNF-Genfamilie initiiert. Deren wichtigste Vertreter sind der Fas-Rezeptor (*First apoptosis signal*, CD95), TNF Rezeptor-1 (TNFR1) und die TRAIL Rezeptoren DR4 und DR5. Im Folgenden wird der TNF-Signalweg beispielhaft näher beschrieben.

TNF wird als Zytokin vor allem bei entzündlichen Prozessen von Makrophagen sekretiert. Hier bewirkt es unter anderem die Aktivierung von Akute-Phase Proteinen und die Initiierung der Apoptose. Bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis werden TNF-alpha-Antagonisten zur Therapie genutzt. Der extrinsische Signalweg der Apoptose beginnt durch die Bindung von TNF an den Rezeptor TNFR1. Dieser besitzt an seinem intrazellulären Anteil eine *Death Domain* (DD), welcher nun das *TNF-receptor-associated-death-domain protein* (TRADD) rekrutiert. An TRADD bindet im nächsten Schritt das *Fas-associated death domain protein* (FADD), welches Procaspase-8 rekrutiert. Durch diese Formation entsteht ein großer Molekülkomplex, welcher als *death inducing signalling complex* (DISC) bezeichnet wird.

Er bewirkt eine autokatalytische Aktivierung von Procaspase-8 in seine aktive Form, welche in Folge die Caspase-Kaskade initiiert. Zusätzlich wird über die Spaltung von *BH3 interacting domain death agonist* (BID) in seine aktive Form tBID der intrinsische Signalweg aktiviert (Jin and El-Deiry 2005) (Abbildung 1).

Der intrinsische Signalweg wird unter anderem durch hitzebedingtem DNA-Schaden initiiert und führt über die Hochregulation von zum Beispiel p53 zur Aktivierung von pro-apoptotischen Proteinen wie *p53-upregulated modulator of apoptosis* (PUMA). Diese binden in der Folge an anti-apoptotische BCL-Proteine wie BCL-2 um die dort gebundenen Proteine *BCL-2-interacting mediator of cell death* (BIM) und BID freizugeben. BIM und BID aktivieren nun die in der äußeren mitochondrialen Membran (MOM) lokalisierten Proteine *BCL-2 associated X, apoptosis regulator* (BAX) und *BCL-2 antagonist/killer* (BAK). Diese formen einen *mitochondrial apoptosis-induced channel* (MAC) in der MOM, durch welchen in den Mitochondrien gebundenes Cytochrom c und Anionen in das Cytoplasma strömen. Der Anionenstrom bedingt im Anschluss durch eine Depolarisation der MOM die Erweiterung der *mitochondrial voltage-dependant-anion-channels* (VDAC), wodurch die Freisetzung von Cytochrom c weiter verstärkt wird. Bei diesem Prozess werden außerdem *second mitochondria-derived activator of caspases* (SMAC) aus den Mitochondrien freigesetzt, welche anti-apoptotische Faktoren wie *x-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) im Cytosol binden und so die Apoptose weiter katalysieren. Das freie Cytochrom c verbindet sich nun mit *Apoptotic protease activating factor – 1* (Apaf-1), ATP und Procaspase-9. Diese Verbindung wird als Apoptosom bezeichnet und schneidet die Procaspase-9 in die aktive Caspase-9 welche in Folge die Caspase Kaskade auslöst (Abbildung 1) (Jin and El-Deiry 2005, Singh, Letai et al. 2019).

Die Caspase Kaskade markiert den entscheidenden Schritt in der Apoptose, die sie entscheidend von der Nekrose abgrenzt und den Namen „programmierter Zelltod“ gibt. Sie bewirkt den kontrollierten proteolytischen Abbau der Zellorganellen, sodass es zunächst zu einer Schrumpfung der Zelle und schrittweise zu einem Zerfall in kleine membranumhüllte Bestandteile kommt, welche als Apoptosekörper bezeichnet werden. Bei diesem Prozess wird das im Regelfall zytoplasmatisch lokalisierte Phosphatidylserin auf der Außenseite dieser Membranbestandteile positioniert. Phosphatidylserin dient als Marker für Makrophagen, welche die Apoptosekörper kontrolliert und ohne Entzündungsreaktion phagozytieren. Bei der Nekrose hingegen, kommt es durch Membranschäden zum unkontrollierten Austritt von Zellbestandteilen und einer Entzündungsreaktion.

Man unterscheidet zwischen aktivierenden (-2, -8, -9, -10) und ausführenden (-3, -6, -7) Caspasen. Die Procaspase-9 des Apoptosoms und Procaspase-8 des DISC spalten Procaspase-3 und Procaspase-7 in ihre aktiven Formen. Caspase-7 spaltet in Folge Procaspase-6, welche wiederum unter anderem Procaspase-7 in seine aktive Form spalten kann und somit autokatalytisch wirkt. Caspase-6 zerschneidet Zellbestandteile wie Lamin A, einen essenziellen Bestandteil des

Zytoskeletts. Caspase-3 ist in der Lage autokatalytisch Procaspase-9 zu spalten, welche wiederum Procaspase-3 spaltet. Caspase-9 führt durch einen bisher unbekannten Mechanismus dazu, dass die Poren des Nukleus erweitert werden, sodass Caspase-3 in den Zellkern gelangt. Dort ist die Endonuklease *intranukleär lokalisierte Caspase-activated deoxyribonuclease* (CAD) an seinen Inhibitor ICAD gebunden. Caspase-3 spaltet nun ICAD, wodurch die Freisetzung von CAD eine DNA-Degradation bewirkt. Außerdem degradiert Caspase-3 Actin und Fodrin, welche ebenfalls wichtige Bestandteile des Zytoskeletts sind. In Folge kommt es zur DNA-Kondensation und Veränderungen des Zytoskeletts, welche als blasenartige Ausstülpungen der Zellmembran morphologisch sichtbar werden (*blebbing*) und zur Fragmentation in Apoptosekörper führen (Fan, Han et al. 2005, Jin and El-Deiry 2005, Tyagi, Pramanik et al. 2019).

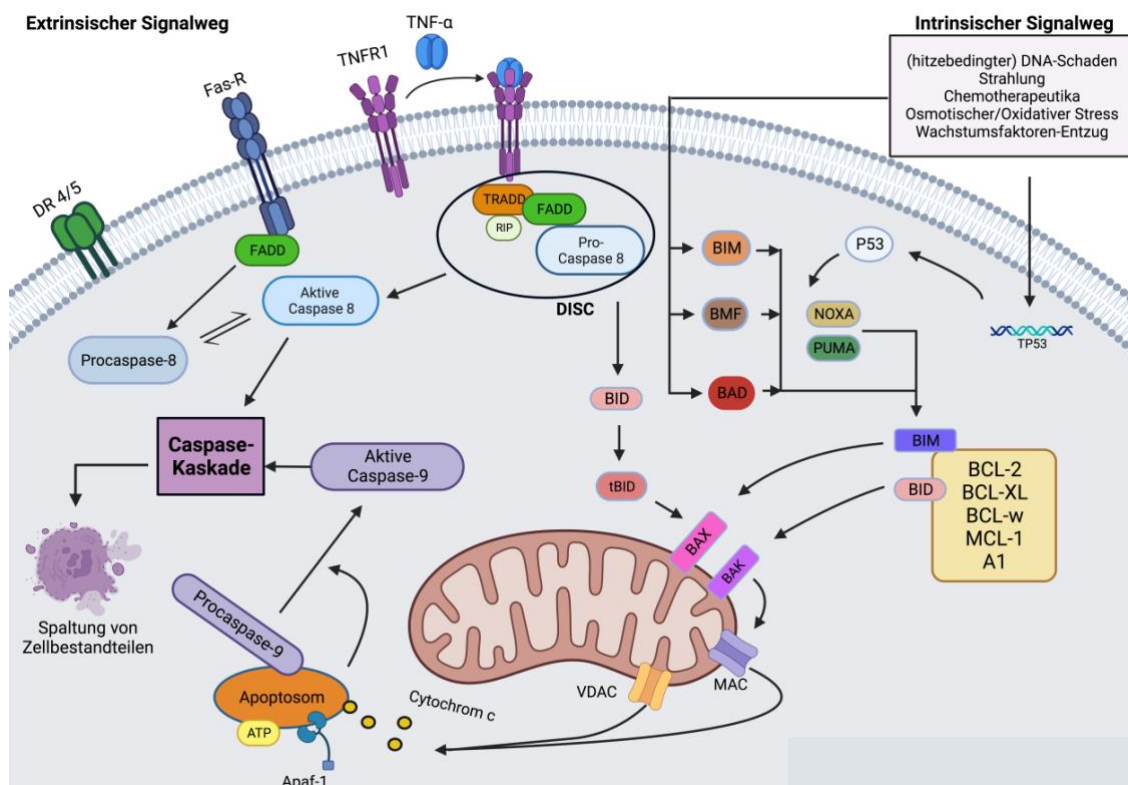


Abbildung 1: Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalwegs der Apoptose. Zur vereinfachten Darstellung wurden einzelne Schritte zusammengefasst, oder vereinfacht. Modifiziert nach (Fan, Han et al. 2005, Czabotar, Lessene et al. 2014), erstellt auf Biorender.com.

4.2.2 Regulatoren der Apoptose

Die Regulation der Apoptose in verschiedenen Geweben unterliegt dem Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen. Dieses Gleichgewicht unterscheidet sich je nach Gewebe und bestimmt die Bereitschaft einer Zelle, die Apoptose einzuleiten. Dies hängt vor allem vom intrinsischen Signalweg ab und ist bedingt durch die exprimierte Menge an BAX und BAK, sowie BCL-2, -XL, -w, welche wiederum BIM oder BAK binden. Die Empfindlichkeit gegenüber einer pro-apoptotischen Therapie kann auch zwischen verschiedenen malignen Erkrankungen oder

deren Subtypen variieren. Die Bereitschaft einer Zelle zur Apoptose bestimmt also auch die potenzielle Wirksamkeit einer pro-apoptotischen Therapie. Diese Bereitschaft kann durch den *Priming*-Grad veranschaulicht werden. Weist eine Zelle einen hohen *Priming* Grad auf, reicht bereits ein geringer Stimulus, wie zum Beispiel eine kurze Hypoxie aus, um die Apoptose zu initiieren. Bei größerer Menge von anti-apoptotischen Proteinen oder geringer Menge von BAX und BAK wird ein stärkerer Stimulus benötigt. Wird wenig bis kein BAX und BAK exprimiert, ist es theoretisch nicht möglich, durch einen pro-apoptotischen Reiz die Apoptose einzuleiten. Hiervon unberührt kann der extrinsische Signalweg sein, welcher weitestgehend unabhängig von der mitochondrialen Signalkette funktioniert (Certo, Del Gaizo Moore et al. 2006, Deng, Carlson et al. 2007, Potter and Letai 2016).

Wenn eine Zelle einen niedrigen *Priming*-Grad hat, kann BCL-2 trotz des Fehlens von essenziellen Wachstums-Zytokinen ein kontinuierliches Überlebenssignal für Tumorzellen erzeugen. Das führt zu einer unkontrollierten Proliferation dieser Zelle in Kombination mit *c-myc* (Vaux, Cory et al. 1988, Chipuk, Moldoveanu et al. 2010).

Generell müssen Tumorzellen jedoch nur die pro-apoptotischen Reize des Alltags, wie kurze Fastenperioden oder Stress, ausgleichen und weisen somit noch immer einen hohen *Priming* Grad auf. Das gilt insbesondere für Zellen des hämatopoetischen Systems, welche generell einen hohen *Priming* Grad aufweisen (Gutierrez-Martinez, Hogdal et al. 2018). So haben Neutrophile nur eine durchschnittliche Lebensspanne von 5,4 Tagen, eine Zeit nach der sie physiologisch unweigerlich in Apoptose gehen (Pillay, den Braber et al. 2010). Dies ist ein Grund dafür, weshalb hämatologische Neoplasien initial ein besonders gutes Ansprechen auf eine Chemotherapie zeigen. Da es jedoch in der Regel nicht möglich ist, im ersten Therapiezyklus 100 % der Leukämiezellen zu eliminieren, findet eine Selektion zugunsten der Zellen statt, welche auf den neuen, stärkeren pro-apoptotischen Reiz mit einer Hochregulation von anti-apoptotischen Proteinen, bzw. der Herabregulation von pro-apoptotischen Proteinen reagieren. Sobald das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Reizen einmal gestört ist, entsteht ein *Circulus vitiosus*, welcher nur durch ein gezieltes und energisches multimodales Eingreifen nachhaltig durchbrochen werden kann. Dies betont die Bedeutung des ersten Therapiezyklus in der Behandlung einer Leukämie.

4.2.3 Messung der Apoptose

Insbesondere die Anzahl der interagierenden pro- und anti-apoptotischen Proteine und Peptide verhindert eine zuverlässige Einschätzung der individuellen Gegebenheiten einer Probe ausschließlich durch Bestimmung der jeweiligen Proteinkonzentrationen mit traditionellen Techniken, wie z.B. dem Western Blot. Um die Interaktionen besser darstellen zu können, haben die Letai-Laboratorien die Methode des BH3-Profilings entwickelt (Certo, Del Gaizo Moore et al. 2006). Der Name bezieht sich hierbei auf die BCL-2 Homologie Proteindomänen, welche von

mit der Abkürzung BH (BCL-2 Homology) von 1 bis 4 durchnummeriert sind und die BCL-2 Familie definieren. Die verschiedenen BH-Domänen binden verschiedene pro- und anti-apoptotische Peptide und erlauben komplexe Interaktionen. Die BH3 Domäne ist Bindungsort für die *Activator* Peptide BID und BIM, sowie die *Sensitizer* Peptide BAD, BIK, NOXA, HRK, BMF und PUMA. Diese *Sensitizer* Peptide stellen das Kernstück des Assays dar. Binden sie an die BH3 Region der anti-apoptotischen Proteine BCL-2, BCL-XL und BCL-w, werden die Bindungsstellen für BID und BIM belegt, welche in der Folge BAX und BAK an der äußeren mitochondrialen Membran (MOM) aktivieren können. Dies löst eine Depolarisation der MOM aus, wodurch Cytochrom c in das Zytoplasma freigesetzt wird und mit Apaf-1, ATP und Procaspase-9 das Apoptosom formt. In Folge wird die Caspase Kaskade ausgelöst, welche die eigentliche enzymatische Degradation der Zelle bewirkt. Die Frage der Aktivierung von BAX und BAK, beziehungsweise der Freisetzung von BID und BIM ist also von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Apoptose. Beim BH3 Profiling werden Mitochondrien auf direktem Weg kontrollierten Mengen an *Activator* und *Sensitizer* Peptiden ausgesetzt. Um dies zu erreichen, wird Digitonin als mildes Detergens eingesetzt, welches die Barrierefunktion der Lipiddoppelschicht der Zellmembran aufhebt und die Mitochondrien einer gleichmäßigen Konzentration der Peptide aussetzt. Die Einleitung der Apoptose kann anschließend auf verschiedene Weise gemessen werden. Hierzu können Fluoreszenz Messungen, Durchflusszytometrie, Mikroskopie oder Western Blots von Cytochrom c genutzt werden. Bei der Durchführung des BH3 Profiling Assays eignet sich die JC-1 Methode besonders gut, um Suspensionen von einheitlichen Zellen zu messen. Die JC-1 Methode benötigt zur Messung einen Mikroplatten Monochromator. Für die Messung gemischter Proben, wie Blutproben eignet sich die aufwendigere iBH3 Methode besser. Hier verwendet man zur Messung die Durchflusszytometrie. Im Folgenden wird beschränkt sich die Erläuterung auf die JC-1 Methode. JC-1 ist ein lipophiler kationischer Carbocyanin Farbstoff, der sich in polarisierten Mitochondrien einlagert. Als Monomer liegt der Farbstoff grün vor, bei einer Anreicherung in Mitochondrien steigt jedoch die Konzentration des Farbstoffs, wodurch er J-Aggregate bildet, welche rot erscheinen und bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen werden können. Hierzu erfolgt die Anregung der Proben bei 545 nm, da so ausschließlich eine Antwort der roten J-Aggregate gemessen wird. Durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol wird die unspezifische Bildung von J-Aggregaten im Zytoplasma verhindert, wodurch rote Signale ausschließlich mitochondrialen Ursprungs sein können. Der Puffer für das Assay (MEB) ist eine ionenfreie Lösung mit kontrollierten pH- Wert, um eine spontane Depolarisation der Mitochondrien zu verhindern. Die Zugabe von Oligomycin blockiert die Repolarisation der MOM durch Hemmung der ATP-Synthase.

Dieses Assay erlaubt Rückschlüsse auf die Bereitschaft oder Resistenz einer Zellpopulation die Apoptose einzuleiten und somit auch auf die Effektivität konventioneller Chemotherapeutika. Es

ist jedoch auch möglich Rückschlüsse auf die beteiligten anti-apoptotischen Proteine (BCL-2, BCL-XL, BCL-w, MCL-1) zu ziehen. Dies wird dadurch ermöglicht, dass *Sensitizer* Peptide unterschiedliche Affinitäten zu den anti-apoptotischen Proteinen besitzen (Chen, Willis et al. 2005, Certo, Del Gaizo Moore et al. 2006, Deng, Carlson et al. 2007). So können PUMA und BMF an allen anti-apoptotischen Proteinen gleichermaßen binden, während HRK ausschließlich an BCL-XL und NOXA an MCL-1 bindet. Andere binden mehrere, jedoch nicht alle anti-apoptotischen Proteine. BAD bindet BCL-2, BCL-XL und BCL-w, BIK zusätzlich noch MCL-1. Bei einer Depolarisation der MOM nach Exposition zu einem dieser Peptide kann also darauf geschlossen werden, dass eins der für das Peptid spezifischen anti-apoptotischen Proteine eine essenzielle Rolle für das Überleben der Versuchszellen spielt.

4.3 Therapie der AML

Zur Klassifikation der Leukämie und Risikostratifizierung erfolgt zunächst eine umfangreiche Diagnostik mit diversen Laboruntersuchungen, sowie Evaluation von Dissemination und Organbefall. Die anschließende Induktionstherapie zielt auf eine möglichst schnelle, aggressive und nachhaltige Eradikation aller leukämischen Zellen ab. In Deutschland wird hierzu eine hochdosierte Zytostatikatherapie mit Cytarabin, Etoposid und liposomal verpacktem Daunorubicin oder Idarubicin verabreicht. Nach dem 2. Block dieser Therapie erreichen ca. 90 bis 94 % der Patienten eine Remission.(Creutzig 01/1997, Creutzig, Zimmermann et al. 2013, Ribeiro 2014). Die Indikation zur hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) wird seit 2012 restriktiver gestellt, da die Risiko-Nutzen-Abwägung bei erhöhtem Zweitmalignom Risiko, chronischer Graft-versus-Host Reaktion und damit verbundenen Organschäden nicht immer eindeutig ist. So ist die HSZT immer noch einem Rezidiv indiziert, sowie initial bei einer Zytogenetik mit schlechter Prognose, oder bei schlechtem Therapieansprechen (Reinhardt, Von Neuhoff et al. 2012). Es herrscht jedoch ein Konsens darüber, dass nach HSZT das Rezidivrisiko deutlich gesenkt ist, dies korreliert jedoch nicht zwangsläufig mit der 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit (Ribeiro 2014). Der starke antileukämische Effekt beruht auf der *Graft-versus-Leukemia* Reaktion, in der transplantierte allogene T-Lymphozyten die restlichen leukämischen Zellen im Knochenmark des Empfängers eliminieren, welche zuvor durch ein myeloablatives Konditionierungs-Regime bereits deutlich dezimiert wurden.

Aktuell werden in Deutschland 97,2 % der Patienten mit einer kindlichen AML im Rahmen von Studien behandelt, welche neue Therapieregime evaluieren (Kaatsch 2018).

4.4 B-cell-lymphoma-Protein (BCL) Inhibitoren

Die Suche nach neuen gezielten Therapiestrategien für ein multimodales Konzept hat in den letzten zehn Jahren zunehmend pro-apoptotische Substanzen wie ABT-737, ABT-263 und ABT-199 in den Mittelpunkt gerückt. Diese Substanzen werden BH-3-Mimetika genannt, weil sie an

die *Bcl-2 Homology* (BH) Bereiche der anti-apoptotischen BCL Proteine (BCL-2, BCL-XL (*BCL-2-like protein 1, isoform long*), BCL-w (*BCL-2-like protein 2*), MCL-1 (*myeloid cell leukemia 1*), A1 (*BCL-2-related protein A1*, auch bekannt als BFL-1)) binden. Die BCL Proteine sind größtenteils in der MOM lokalisiert und verhindern dort die MOMP durch Bindung von BAX und BAK. Man unterscheidet zwischen den Bindungsstellen BH 1 – 4, BH 1 – 3 bilden zusammen eine tertiäre Bindungsstruktur für die BH-3 Bereiche der pro-apoptotischen Proteine. Die BH-3 Mimetika binden nun in den BH-3 Bereichen der BCL Proteine und lösen so dort gebundenes BAX und BAK, was in Folge den intrinsischen Signalweg der Apoptose initiiert (Potter and Letai 2016).

In präklinischen und klinischen Studien zeigten BH-3 Mimetika eine große Wirksamkeit, wobei es im präklinischen Ansatz bei ALL möglich war, durch Kombination mit CDK-Antagonisten einen großen Anteil an Remission zu erzielen, eine Tendenz, welche sich auch im klinischen Ansatz bei der Therapie der CLL widerspiegelt (Roberts, Seymour et al. 2012, Vandenberg and Cory 2013). Bei B-lymphoblastischer Leukämie (B-ALL) führt die Hemmung von BCL-2 zu einer Verringerung der Lymphozytose und zu einem Überlebensvorteil (Letai, Sorcinelli et al. 2004). Der BCL-2 selektive Inhibitor ABT-199 (Venetoclax) ist bereits ein fester Bestandteil der CLL-Behandlung bei Erwachsenen und stellt dort eine Therapieoption für Hochrisiko-Patienten dar (Gentile, Petrongaro et al. 2017). Außerdem hat sich ABT-199 als Behandlungsteil der AML bei Erwachsenen bewährt und hat 2020 die *U.S. Food & Drug Administration (FDA)*-Zulassung für neu aufgetretene AML in Erwachsenen > 75 Jahren in Kombination mit Azacitidin, Decitabin, oder niedrig dosiertem Cytarabin erhalten (Das 2018, FDA 2020). Die orale Bioverfügbarkeit verleiht dem BAD-ähnlichen BH3-Mimetikum ABT-263 gegenüber seinem Vorläufer ABT-737 hier einen klinischen Vorteil in der Anwendung. Wie ABT-737 hat es eine hohe Affinität zu BCL-2, BCL-XL und BCL-w, setzt gebundene BH-3-Proteine frei und fördert somit die Apoptose (Tse, Shoemaker et al. 2008). ABT-737 zeigte bereits bei mehreren neoplastischen Erkrankungen seine Fähigkeit refraktäre Klone zu eliminieren. Hierbei wurde auch deutlich, dass BH3-Mimetika wie ABT-737 dazu genutzt werden können synergistisch mit etablierten Chemotherapeutika Regimen eingesetzt zu werden. So werden durch die konventionelle Therapie induzierte Selektion unter den Krebszellen anti-apoptotische Proteine hochreguliert, welche in Folge durch ABT-737 eliminiert werden, was unter anderem bei der AML gezeigt werden konnte (Baev, Krawczyk et al. 2014, Kim, Jung et al. 2017, Rao, Li et al. 2017, Zhang, Yu et al. 2017).

Die klinische Wirksamkeit von ABT-263 wurde unter anderem bei Studien zur Behandlung von SCLC (Gandhi, Camidge et al. 2011) und chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) deutlich. So führte die Therapie mit ABT-263 bei CLL zu einer Verringerung der Tumorlast und einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens auf bis zu 25 Monate (Del Gaizo Moore, Brown et al. 2007, Roberts, Seymour et al. 2012). Die Wirksamkeit von BH-3-Mimetika könnte von den Expressionsverhältnissen der Proteine der BCL-2-Familie abhängen. Hier scheinen erhöhte

Spiegel von BCL-2/BIM-Komplexen für die Therapie günstiger zu sein als hohe Spiegel von BCL-XL/BIM-Komplexen (Certo, Del Gaizo Moore et al. 2006, Merino, Khaw et al. 2012). Unberührt davon wurde auch für BCL-XL eine deutliche antileukämische Wirkung nachgewiesen, was einen synergistischen Effekt einer gemeinsamen Hemmung von BCL-2 und BCL-XL nahelegt (Zhou, Xu et al. 2015). Die Expressionsniveaus der BH3 Proteine scheinen zusammen mit dem *Priming*-Grad die Wirksamkeit einer BCL-2/BCL-XL-Hemmung zu bestimmen (Certo, Del Gaizo Moore et al. 2006, Potter and Letai 2016). Bei pädiatrischer ALL war es möglich, durch die Untersuchung der genetischen und Proteinexpressionslevel von BCL-2/BCL-XL in Verbindung mit BH3-Profilung eine Einschätzung der *in-vivo*-Wirksamkeit von ABT-263 zu treffen (Suryani, Carol et al. 2014). Obwohl die Hochregulation von BCL-XL eine häufige Resistenz gegen die Hemmung von BCL-2 darstellt, scheint dies für ABT-263 kein Hindernis zu sein (Merino, Khaw et al. 2012, Choudhary, Al-Harbi et al. 2015). Entscheidend für die Anwendung von ABT-263 ist auch die Toxizität der Therapie. Hier zeigt es sich von Vorteil, dass die Inaktivierung von BCL-2, BCL-XL und BCL-w zur Verringerung der Menge an AML-Blasten führt, während die Vitalität der Stammzellen nicht beeinflusst wird (Konopleva, Contractor et al. 2006, Konopleva and Letai 2018). Dosislimitierend zeigt sich hier jedoch eine durch die BCL-XL Inhibition bedingte Thrombozytopenie, eine Nebenwirkung welche bei dem BCL-2 selektiven Inhibitor ABT-199 nicht auftritt (Vandenberg and Cory 2013, Debrincat, Pleines et al. 2015). In klinischen Studien zur Behandlung der AML verstärkt die BCL-2 Hemmung zytotoxische Wirkungen etablierter Chemotherapeutika bei Erwachsenen und könnte daher bei malignen hämatologischen Erkrankungen von Vorteil sein (Konopleva and Letai 2018). Ob ABT-263 eine wirksame Therapie der AML im Kindesalter sein könnte, ist noch nicht hinreichend geklärt. Es gibt bisher nur wenig Literatur zu BH3-Mimetika bei malignen pädiatrisch-hämatologischen Neoplasien. Noch ist nicht abschließend geklärt, ob die vielfältigen AML-Untergruppen wie KMT2Ar oder ML-DS für eine pro-apoptotische Therapie anfällig sind und wie die therapeutische Breite *in vivo* und vor allem klinisch-pädiatrisch zu beurteilen ist (Konopleva, Contractor et al. 2006, Suryani, Carol et al. 2014, Konopleva and Letai 2018). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass eine BCL-2 Inhibition in Kombination mit Cytarabin oder Azacitidin/Decitabin in der Behandlung von KMT2Ar AML klinisch wirksam ist (Masetti, Baccelli et al. 2023).

Daher stellten wir die Frage, ob die pharmakologische Hemmung von BCL-2, BCL-XL und BCL-w durch ABT-263 das Fortschreiten der pädiatrischen AML limitiert, das Überleben verlängert und ob hierbei Unterschiede zwischen monozytärer (KMT2Ar) und DS-megakaryoblastischer (ML-DS) Leukämie bestehen. Außerdem stellten wir uns die Frage bezüglich der Vorhersagbarkeit einer erfolgreichen pro-apoptotischen Therapie der kindlichen AML, was in Hinblick auf eine mögliche Therapieplanung und Selektion von Patienten von entscheidender

Bedeutung wäre. Hier versuchten wir Prädiktoren für eine erfolgreiche Therapie mit ABT-263 zu identifizieren.

Um diese Frage zu beantworten, verglichen wir verschiedene AML-Untergruppen, untersuchten ihr Dosis-Wirkungs-Profil, validierten den pro-apoptotischen Effekt mittels Annexin V-Assays und bestimmten das Expressionsprofil von Zelllinien und Patientenzellen, sowie die Abhängigkeit von bestimmten Proteinen der BCL-2 Familie und das *Priming* der Zellen unter Verwendung von Western Blot, shRNA Knockdown und BH3-Profiling Assays. Abschließend haben wir in einem *Patient derived Xenografts* (PDX) -Mausmodell Endpunkt- und Überlebensunterschiede zwischen den verschiedenen Untergruppen unter ABT-263-Behandlung bestimmt. Zur Evaluation der therapieinduzierten Unterschiede von Behandlungs- und Kontrollgruppe wurden mRNA-Expressionsprofile sequenziert und miteinander verglichen.

5 Zielstellung

Ziel der Arbeit war die präklinische Testung des BCL-2/BCL-XL Inhibitors Navitoclax (ABT-263) zur Wirksamkeit bei pädiatrischer megakaryoblastischer Leukämie bei DS (ML-DS) und monozytärer Leukämie mit *KMT2A* Aberration (KMT2Ar). Hierzu sollte mittels neuer und etablierter experimenteller *in vitro* und *in vivo* Methoden, die Wirksamkeit umfassend gezeigt werden. Außerdem sollten möglichst die Hintergründe von Wirksamkeit und Resistenz beleuchtet werden. Ebenso stellten wir uns die Frage nach der Translation von *in vitro* Ergebnissen auf die Wirksamkeit im Mausmodell.

6 Material und Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle *in vitro* Experimente wurden zur Verifizierung der Ergebnisse mindestens in 2-facher Ausführung durchgeführt und mindestens 3-mal wiederholt.

6.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erworben und wurden monatlich mittels *luminescent cell viability Assays* (Celltiter Glo®, Promega GmbH, Deutschland) auf eine Mycoplasma-Kontamination getestet. Die Arbeit mit den Zellkulturen erfolgte unter sterilen Werkbänken mit vertikalen Luftströmen. Es wurden die geltenden S2 Hygienebestimmungen eingehalten. Patientenzellen wurden als tertiäres Xenotransplantat in den Versuch genommen. Alle Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ und 96% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die folgenden Materialien wurden zur Kultivierung verwendet: RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich), hitzeinaktiviertes, gefiltertes fötales Rinderserum (FBS) (Gibco, Thermo Fisher, Herkunft: Brasilien), Penicillin / Streptomycin (Gibco, Thermo Fisher), Natriumpyruvat 100 mM (Gibco, Thermo Fisher), CD-Lipidkonzentrat (Gibco, Thermo Fisher), rekombinanter menschlicher FLT3-Ligand (Peprotech), rekombinanter menschliches SCF (Peprotech), rekombinantes menschliches IL-6 (Peprotech), rekombinantes menschliches IL-3 (Peprotech) rekombinantes menschliches TPO (Peprotech). ML-2 und MOLM-13 Zellen wurden in RMPI 1640-Medium (Sigma-Aldrich) kultiviert, ergänzt mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Natriumpyruvat. CMK-Zellen wurden in RMPI 1640-Medium kultiviert, ergänzt mit 20 % FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Natriumpyruvat. MO7e-Zellen wurden in RMPI 1640-Medium kultiviert, ergänzt mit 20% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Natriumpyruvat und 10 ng/ml IL-3. Die Patientenzellen wurden in Stemspan HSC-Medium (Stem Cell Technologies) kultiviert, ergänzt mit 1% Penicillin/Streptomycin, 50 ng/ml SCF, 50 ng/ml FLT3, 10 ng/ml IL-6, 2,5 ng/ml IL-3, 20 ng/ml TPO, 1: 250 kultiviert Lipidkonzentrat und 0,75 uM SR1 (Sigma Aldrich) (43). Humane hämatopoetische Stammzellen wurden in Stemspan HSC-Medium (Stem Cell Technologies) kultiviert, ergänzt mit 1% Penicillin/Streptomycin, 100 ng/ml SCF, 100 ng/ml FLT3, 20 ng/ml IL-6, 50 ng/ml TPO und 1: 250 Lipidkonzentrat. Die Vitalität der Zellen wurde mit einem 0,2% Trypanblau-Färbung Ausschlusstest (Gibco, Thermo Fisher) und Hämozytometer-Mikroskopie Zählungen in regelmäßigen Abständen von 2 Tagen gemessen. Die Zellen wurden täglich mikroskopisch begutachtet und deren Wachstum und Dichte geschätzt. Bei einem Zuwachs von circa 80% wurde die Zellkultur umgesetzt. Hierzu wurden die Zellen in Suspension gebracht, mittels Zentrifugation bei 300 x g wurde ein Zellpellet gebildet. Das alte Medium wurde anschließend als Überstand entfernt und durch die doppelte Menge frischen und im Wasserbad erwärmten Mediums ersetzt. Um eine Kontamination zu verhindern, wurde für

jede Zelllinie ein eigenes Medium verwendet, anschließend wurden die Zellen schonend in neue Inkubationsbehälter überführt. Um die Zellen über einen längeren Zeitraum verwenden zu können, wurden Proben bei -80 °C kryokonserviert. Hierzu waren einige Vorbereitungsschritte nötig. Zuerst wurden die Zellen mittels Hämozytometer gezählt. Bei ausreichender Zellzahl von circa 5×10^6 Zellen wurden diese in Suspension gebracht und in separate konische Zentrifugenröhrchen (Thermo Fisher, Falcon) gefüllt. Anschließend wurden die Zellen bei 300 x g zentrifugiert und das Zellpellet mit einem frisch präparierten Medium aus 90% FBS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Carl Roth) suspendiert und in Kryoröhrchen (Thermo Fisher, Nunc) überführt. Anschließend wurden die Röhrchen in einen mit Isopropanol gefüllten Container überführt welcher zuvor über Nacht auf 4 °C gekühlt wurde. Das Einfrieren in einem mit Isopropanol gefüllten Container bewirkt eine langsamere Kühlung auf -80 °C um circa -1 °C pro Stunde und somit eine schonendere Prozedur für die Zellen. Für eine langfristige Lagerung über mehrere Monate wurden die Kryoröhrchen circa 24 Stunden später in einen Flüssigstickstofftank überführt und bei -196 °C eingelagert. Für den Auftauprozess wurden die Röhrchen aus dem Tank entnommen und auf Trockeneis zum Wasserbad transportiert. Hier wurden sie für 2 - 3 Minuten bei 37 °C erwärmt und sofort schonend in konische Zentrifugenröhrchen überführt. Diese wurden dann bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt und mit aufgewärmtem Medium aufgefüllt. Anschließend erfolgte ein 0,2% Trypanblau-Färbung Ausschlusstest, sowie die Zählung mittels Hämozytometer, um den Anteil an vitalen Zellen zu bestimmen. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert, das Pellet mit frischem Medium re-suspendiert und in ein geeignetes Inkubationsgefäß überführt.

6.2 Patientenzellen

Im Rahmen der Arbeit wurden Patientenzellen verwendet, welche als tertiäre Xenotransplantate in die Versuche genommen wurden (Tabelle 3, Anhang). Diese wurden zunächst seitens der betreuenden Einrichtung von verschiedenen kooperierenden Einrichtungen in Deutschland gewonnen und in einer Biobank konserviert. Die Nutzung der Zellen erfolgte unter Beachtung der einschlägigen rechtlichen und ethischen Vorgaben. Die Verwendung der Zellproben ist durch das positive Ethikvotum der Ethikkommission (Votum Nr. 2018-03) gedeckt. Alle Daten und Materialien wurden anonymisiert und in Übereinstimmung mit den datenschutzrechtlichen Bestimmungen verwendet.

6.3 Dosis-Wirkungs-Kurven-Assay und EC₅₀-Berechnung

Um die Wirksamkeit von ABT-263 in verschiedenen AML-Subtypen abzuschätzen, führten wir Dosis-Wirkungs-Versuche durch. ABT-263 (Navitoclax) wurde von Adooq Bioscience, Kalifornien, erworben und in DMSO (CarlRoth) suspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C in Aliquots von 100 µl, um repetitive Auftauzyklen zu vermeiden und eine verlängerte Lagerung zu

ermöglichen. Vor Versuchsbeginn wurden die Platten und das Medium auf Raumtemperatur erwärmt. Die Zellen wurden in konische Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet mit frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Hämozytometer gezählt, die benötigte Anzahl an Zellen wurden direkt in 96-Well Zellplatten mit flachem Boden ausgesät und die nicht für den Versuch benötigten Zellen mit frischem Medium zurück in ein passendes Inkubationsgefäß gegeben. ABT-263 wurde in 96-Well-Mikroplatten (Sarstedt) mit einem Volumen von 75 µl pro Well und Konzentrationen von 0,5 nM; 1,52 nM; 4,57 nM; 13,72 nM; 41,15 nM; 123,46 nM; 370,37 nM; 1,11 µM; 3,33 µM; 10 µM seriell in Duplikaten titriert, wobei 10 µM DMSO und unbehandeltes Medium als Kontrollen dienten. Die Zellen wurden anschließend mit einem Volumen von 75 µl pro Well und einer Dichte von 10000 Zellen pro Well für Zelllinien und 25000 Zellen pro Well für Patientenzellen ausgesät, sodass ein Endvolumen von 150 µl pro Well entstand. CD34 + humane hämatopoetische Stammzellen (HSPC) dienten als Kontrollgruppe für die Patientenzellen. Nach 72 Stunden Inkubation bei 37 ° C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ und 96% Luftfeuchtigkeit wurde die Vitalität der Zellen mittels eines *luminescent cell viability Assays* (Celltiter Glo®, Promega GmbH, Deutschland) (Betz 2007) gemäß dem Protokoll des Herstellers gemessen. Hierzu wurden die Zellen mittels einer Mehrkanalpipette in Suspension gebracht und in eine konische 96-Well Platte überführt, bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand abgezogen, mit der CellTiterGlo Reagenz (Promega) resuspendiert und anschließend in eine weiße, intransparente 96-Well Platte (Corning) überführt. In dieser wurde dann nach 15-minütiger Inkubation mit dem Reagenz die Messung im GloMax Analysis Mikroplatten Luminometer (Promega) analysiert. Durch die Zugabe des Reagenzes werden die zu untersuchenden Zellen lysiert, das ATP der Zellen reagiert und kreiert ein lumineszierendes Signal, welches proportional zum Anteil der vitalen Zellen in der Kultur nach der Behandlung mit ABT-263 ist. Dieses Signal ist über mindestens fünf Stunden konstant und erlaubt Rückschlüsse über das Ausmaß der durch ABT-263 induzierten Apoptose. Unter Verwendung der GraphPad Prism 9-Software wurden die Ergebnisse normalisiert und logarithmisch transformiert. Die Graphen wurden mit einer 3-Parameter-Anpassung der Daten erstellt und anschließend bearbeitet.

6.4 Messung der Apoptose

Die pro-apoptotische Wirkung von ABT-263 in AML-Subtypen wurde mit einem Annexin V-Assay validiert. Annexin V-Bindungspuffer wurde von BD Pharmingen bezogen. Mittels Durchflusszytometrie lassen sich mithilfe von an Annexin V bindenden FITC-Antikörpern apoptotische Zellen zuverlässig markieren und detektieren.

Zelllinien und Patientenzellen wurden Konzentrationen von 100 nM, 500 nM, und 1 µM ABT-263 ausgesetzt, wobei 1 µM DMSO als Kontrolle diente. CD34⁺ humane hämatopoetische Stammzellen (HSPC) dienten als Kontrollgruppe. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen

in eine konische 96-Well Platte überführt, bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Thermo Fisher) gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, Die Zellen mit Annexin V Färbepuffer resuspendiert und die Apoptoserate nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln mittels Durchflusszytometrie (Cytoflex S, Beckman Coulter Life Sciences) bestimmt. Der Färbepuffer wurde zuvor frisch angemischt durch Zugabe von FITC Annexin V Antikörper (BD Pharmingen) und 4'6-Diamin-2-phyindol (DAPI) zum Bindungspuffer. Die Daten wurden mit Kaluza Analysis analysiert und ein Graph aus den daraus generierten Prozentwerten in Graphpad Prism 9 erstellt.

6.5 Western Blots

Das BCL-2/-XL Expressionsprofil von Zelllinien und Patientenzellen wurde unter Verwendung von Western-Blot Assays ermittelt. Die folgenden Antikörper wurden verwendet: Bcl-2-Kaninchen-mAb (humanspezifisch, Cell Signaling Technology), Bcl-XL-Kaninchen-mAb (humanspezifisch, Cell Signaling Technology). Zur Proteinisolation wurden die Zellen mittels Hämozytometer gezählt und 1×10^6 Zellen in konische Zentrifugenröhrchen überführt, bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurde das Pellet mit 500 µl Radioimmunpräzipitationsassay (RIPA) -Puffer (Thermo Fisher) re-suspendiert und 45 Minuten lang auf Eis inkubiert. Der RIPA-Puffer bewirkt eine schnelle Lyse und ermöglicht die Solubilisierung von intrazellulären Proteinen. Die Suspension wurde nun bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge für 30 Minuten erneut zentrifugiert und der klare Überstand in ein neues, vorgekühltes Zentrifugenröhrchen transferiert. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration verwendeten wir das Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Fisher). Das Reagenz wurde bei Raumtemperatur mehrmals vorsichtig invertiert und gemischt. Jeweils 10 µl der Proteinproben wurden von den Probenröhrchen auf eine Mikrotiterplatte übertragen und mit 300 µl Coomassie Plus Reagenz für 30 Sekunden gemischt. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin (BSA) (Thermo Fisher), die Proteinkonzentration wurde mit einer Standardkurve ermittelt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Proben mit einem Spektralphotometer (Nanodrop, Thermo Fisher) bei 595 nm gemessen. Zur Gel Herstellung wurde das TGX Fast Cast Acrylamide Kit 10 % (Bio-Rad) verwendet und nach Herstellerangaben angemischt. Die Mixtur wurde anschließend vorsichtig blasenfrei in Glasplatten mit einem 1,0 mm Abstand zueinander (Bio-Rad) pipettiert und mit Isopropanol bedeckt, damit eine gleichmäßige Oberfläche entstand. Zur besseren Stabilisierung während des Transfers wurden diese in dem Mini-PROTEAN Tetra cell casting Ständer (Bio-Rad) fixiert. Ein Kamm formte während der Polymerisation des Gels die Versuchskammern vor. Nach 30-45 Minuten war die Polymerisation abgeschlossen, die Gele wurden in den Tank Blotter (Mini PROTEAN Tetra cell tank, Bio Rad) transferiert und der Tank

mit Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid (SDS) Gel-Elektrophorese-Puffer gefüllt. Der SDS-Puffer bewirkt eine anionische Ladung der Proteine, deren Eigenladung im oberen pH-Bereich des Gels und des anionischen SDS-Puffers vernachlässigbar ist. Drei Teile 4x Laemmli Probenpuffer (Bio-Rad) wurden mit einem Teil Probe gemischt. Durch 5 bis 10-minütiges Kochen der Proben bei 95 °C wurden die Proteine denaturiert und durch das anionisch-kationische Ladungsungleichgewicht der Proteine und des SDS-Puffers zusätzlich linear angeordnet. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt, wurden sie in die durch den Kamm vorgeformten Vertiefungen des Gels pipettiert. 5-10 µl vorgefärbte Protein Standards (Precision Plus Protein, Bio-Rad) dienen der Größenbestimmung. Bei Anlage einer Spannung von 100-150 V für 1-2 Stunden bewegten sich die Proteine somit in Richtung der Kathode und werden entsprechend ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Im Anschluss wurde der Proteintransfer mit einem *Semi-dry Blot* System (Trans-Blot-Turbo, Bio-Rad) auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran vorgenommen. Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran durch ein kurzes Eintauchen in absolutes Methanol aktiviert. Hierbei wurden die Proteine aus dem Gel unter Anlage einer Spannung von 20 V auf die polare und hydrophobe PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde im Anschluss mit 5% fettfreier Trockenmilch (BioRad) in Tris-gepufferter Natrium Lösung mit Tween 20 (TBS-T, Bio-Rad) bedeckt und für eine Stunde auf einem Laborschüttler inkubiert. Hierdurch wurden freie Bindungsstellen der Proteine blockiert und so eine unspezifische Antikörperbindung verhindert. Die proteintragenden Abschnitte der Membran wurden ausgeschnitten und über Nacht bei 4°C in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen in 5% BSA-Lösung in TBS-T mit dem primären Antikörper (BCL-2 oder BCL-XL) inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran 3-fach mit TBS-T für 10 Minuten auf einem Laborschüttler in TBS-T gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen, Abcam) in 1:10000 Verdünnung in 5% Milch und TBS-T auf einem Laborschüttler inkubiert und die 3-fache Waschung mit TBS-T wiederholt. Für die Chemilumineszenz Detektion wurde die Membran mit Amersham ECL Prime Detektionsreagenz (Amersham) bedeckt, wir verwendeten das Chemidoc MD Imaging System (Bio-Rad) zur Visualisierung der Chemolumineszenz der Banden. Die Ergebnisse wurden mithilfe der Image Lab Software (BioRad) analysiert.

6.6 shRNA induzierter BCL-2 / -XL-Knockdown

Um die vitale Abhängigkeit der AML-Subtypen von BCL-2 und/oder BCL-XL abzuschätzen, führten wir ein shRNA-Knockdown-Experiment von BCL2 und BCLXL in den Zelllinien und Patientenzellen durch.

Tabelle 1 zeigt die verwendeten Oligonukleotide (Oligos), miR-E-GFP und miR-E-dTomato (ohne Insert) dienten als Kontrollen. Es wurden 3 verschiedene shRNA Konstrukte, jeweils für

BCL-2 und BCL-XL getestet, um eine optimale Herunterregulation zu erzielen. Die zwei effektivsten shRNAs wurden in nachfolgenden Experimenten weiterverwendet.

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung

	<u>SIN40C.SFFV.BCL2</u>	<u>SIN40C.SFFV.BCLXL</u>
VW	5'- AGCGCGAGGATCATGCTGTACTTAA ATAGTGAAGCCACAGAT- GTATTTAAGTACAGCATGATCCTCT- 3 '	5'- AGCGAACAGCATATCAGAGCTTTGA ATAGTGAAGCCACAGA- TGTATTCAAAGCTCTGATGCTGTC-3 '
RW	5'- GGCAAGAGGATCATGCTGTACTTAA ATACATCTGTGGCTTCACT- ATTTAAGTACAGCATGATCCTCG-3	5'- GGCAGACAGCATATCAGAGCTTTGA ATACATCTGTGGCTTC- ACTATTCAAAGCTCTGATGCTGTT-3 '

6.6.1 Transformation

Die Oligos wurden in Tris/EDTA Puffer (Thermo Fisher) gelöst und durch 10-minütige Inkubation bei 4 °C und einem 40-sekündigem Hitzeschock bei 42 °C, anschließender erneuter 2-minütiger Inkubation bei 4°C in XL1-Blue E. Coli Bakterien transformiert. Die Reaktion wurde abgeschlossen durch eine 45-minütige Inkubation bei 37 °C und 450 rpm auf einem Laborschüttler im Inkubator. Im Anschluss wurden die Kolonien auf LB-Platten, welche mit Ampicillin in einer Konzentration von 10 mg/ml vorbehandelt waren, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde eine gut ausgebildete Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in einem konischen Zentrifugenröhrchen mit 4 ml LB-Medium (Thermo Fisher), welches mit Ampicillin in einer Konzentration von 10 mg/ml versetzt war, gelöst. Die suspendierte Kolonie wurde in dem Zentrifugenröhrchen als Vorkultur über 6-8 Stunden bei 37 °C inkubiert. Um einen größeren Umsatz zu generieren, wurde im Anschluss in einem Erlenmeyer Kolben eine Maxi Prep Kultur angelegt, bei der die Vorkultur in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin gelöst und für 16 Stunden bei 37 °C auf einem Laborschüttler inkubiert wurde.

6.6.2 Transfektion

Human embryonic kidney 293t (HEK-293t) -Zellen wurden am Vortag der Transfektion auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät. Eine Konfluenzdichte von 70 bis 80%

ist wünschenswert für eine optimale Zellgesundheit und Reproduzierbarkeit des Versuchs. Bei zu hoher Konfluenzdichte sind niedrige Transfektionsraten zu erwarten und bei spärlicher Zellverteilung kann die virale Toxizität zu hoch sein. Pro Petrischale wurden 6 µg Vektor, 10 µg psPax2 (Lentiviraler Packaging Plasmid), 2 µg pMD2.g (Lentiviraler Envelope Plasmid), 200 µl serumreduziertes Medium (Opti-MEM, Thermo Fisher) und 200 µl Polyethylenimin (PEI) Lösung (Polysciences) gegeben und vorsichtig gemischt. Es ist notwendig, die lentivirale Transfektion mit mehreren Oligos vorzunehmen, da diese Virus Art auf HIV-1 basiert und das Potenzial für eine zufällige Mutagenese hat. Die Oligos kodieren für Teile der viralen Hülle und des Kapsids und verhindern so eine unkontrollierte Infektion des Anwenders. Im Anschluss wurden die Platten für 8 Stunden inkubiert, danach wurde das Medium vorsichtig aspiriert und durch Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM+, Thermo Fisher) ersetzt. 26 bis 32 Stunden nach erfolgter Transfektion wurden die lentiviralen Überstände von SIN40C.SFFV.BCL2 oder SIN40C.SFFV.BCLXL in ein 50 ml konisches Zentrifugenröhrchen pipettiert und für 5 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend schonend durch ein 0,45 µm Filter in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und die virale Suspension bei hoher Geschwindigkeit von 11000 G für 3 Stunden bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit dem entsprechenden Medium der zu untersuchenden Zelllinie resuspendiert und in einem Volumen von 100 µl aliquotiert und bei -80 °C eingelagert.

6.6.3 Transduktion und kompetitives Knockdown

Zelllinien und Patientenzellen wurden anschließend entweder mit SIN40C.SFFV.BCL2 oder SIN40C.SFFV.BCLXL transduziert, die mit GFP bzw. dTomato markiert waren, mir-E-GFP und mir-E-dTomato dienten als Kontrollen. Zunächst musste der nötige Virustiter für eine optimale Transduktionsrate von circa 35% der Zellen titriert werden. Dies war nötig, da bei Transduktionsraten über 50% von mehrfacher Virusintegration in die DNA der Zellen auszugehen ist, was die Versuchsergebnisse verfälschen kann. Hierzu wurden 500×10^3 Zellen pro Well in einer 24-Well Platte ausgesät und zunächst eine einheitliche Menge von 2,5 µl Virus pro Probe hinzugegeben. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurde durchflusszytometrisch die Transduktionsrate ermittelt, hierzu wurde ein Analysepanel aus 1% DAPI, dTomato und GFP für die Analyse verwendet. Dieses Panel ermöglicht den Vergleich zwischen der Vitalität der transduzierten und den nicht transduzierten Zellen, sowie die Differenzierung zwischen vitalen und toten Zellen. In Abhängigkeit von der gemessenen Transduktionsrate wurde die hinzugegebene Virusmenge angepasst, um die gewünschte Transduktionsrate von ca. 35% zu erreichen. Dieser Versuch wurde jeweils 3-mal wiederholt.

Die Zelllinien CMK, MO7e und ML-2, sowie die Patientenzellen wurden mit der individuell angepassten Virusmenge transduziert und die Vitalität der Zellen über einen Zeitraum von 21 Tagen in 3-tägigen Intervallen mittels Durchflusszytometrie und dem Analysepanel aus DAPI,

dTomato und GFP gemessen. Die Ergebnisse wurden in der Graphpad Prism 9 Software analysiert. Die Signifikanz wurde mittels einer zweifachen Varianzanalyse berechnet.

6.7 BH3-Profiling

Das BH3-Profiling wurde nach dem JC-1-Protokoll der Letai-Laboratorien durchgeführt (Ryan and Letai 2013, Letai 2016).

Die Peptide wurden in 100-facher Versuchskonzentration in DMSO gelöst und die Konzentration mittels Spektralphotometer bei einer Absorption von 280 nm verifiziert, aliquotiert und für 2 Wochen bei -20 °C gelagert. Nach 2 Wochen wurden die Aliquots in eine Lagerung bei -80 °C überführt. Für die Herstellung des JC-1 Puffers („MEB“) wurde 13,56 g Mannitol (150 mM finale Konzentration), 1,19 g HEPES KOH PH 7,5 (10 mM), 0,295 g Succinylsäure (5mM), 0,5 g BSA (0,1%), 1,86 g Kaliumchlorid (50 mM) in einem Kolben gemischt und aufgelöst. Im Anschluss wurden je 20 µl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) hinzugegeben, um freie Calcium Ionen während des Versuchs zu binden, welche die Polarisation der MOM beeinflussen könnten. Der pH wurde auf 7,5 mittels Zugabe von NaOH und HCL unter Messung eines pH-Meters adjustiert und das Volumen mit sterilem, destilliertem Wasser auf 500 ml erhöht. Der Puffer wurde im Anschluss steril in 50 ml konische Zentrifugenröhrchen gefüllt, steril verschlossen und bei 4 °C gelagert. Zur Präparation der Färbelösung wurden vor jedem Versuch in folgender Reihenfolge frisch 5 µl Oligomycin 20 mg/ml (Sigma Aldrich), 5 µl Digitonin 50 mg/ml (Merck Millipore), 100 µl JC-1 in einer Konzentration von 100 mM (Enzo Life Sciences GmbH), 17 µl Mercaptoethanol (5M Konzentration), mit 4873 µl MEB zu einem finalen Volumen von 5 ml gemischt.

Die Peptide wurden in der Färbelösung in 2-facher Versuchskonzentration gelöst und in der gewünschten Reihenfolge auf einer 384 Well-Mikroplatte (Greiner FLUOTRAC™, schwarzes Polystyrol) in 15µl Volumen pipettiert. Etwa 25.000 Zellen wurden in MEB suspendiert und mit der vorgelegten Färbelösung Verhältnis 1:1 gemischt in 25 mM Endkonzentration hinzugefügt. Puma2A wurde als Ladungskontrolle (Negativkontrolle) gleichermaßen zur höchsten Konzentration der Peptide verwendet. Alamethicin (Enzo Life Sciences GmbH) ist ein porenformendes Peptid, welches die Mitochondrien irreversibel schädigt und eine BAX/BAK-unabhängige Depolarisation der MOM auslöst. Es diente als Depolarisationskontrolle (Positivkontrolle) in 12,5 µM Endkonzentration. Die Messungen wurden unverzüglich nach Zugabe der Zellen in 5-minütigen Abständen bei einer Temperatur zwischen 28,0 und 32,0 °C mit einem Mikroplatten Monochromator (Tecan Infinite® M1000) für eine Dauer von 3 Stunden durchgeführt. Das vorherige Aufheizen des Monochromators war essenziell, da die Reaktion nur bei einer Temperatur >28 °C ablaufen kann, eine Temperatur > 32 ° jedoch eine spontane (peptidunabhängige) Depolarisation der MOM auslösen kann. Die Proben wurden bei 544 nm angeregt und die Fluoreszenzemission wurde bei 590 nm gemessen. Die Fläche unter der Kurve

(AUC) wurde mit GraphPad Prism 9 berechnet. Anschließend wurden die AUC-Werte der Peptide im Verhältnis zur Positiv- und Negativkontrolle normalisiert, sortiert und graphisch veranschaulicht.

6.8 Tierversuche

Um die *in-vivo*-Wirksamkeit von ABT-263 zu testen, haben wir ein Xenotransplantat-Mausmodell (PDX) mit 8 verschiedenen tertiären Patientenproben erstellt. Alle Tierversuche wurden in Einklang mit dem § 8 Absatz 7, Satz 2 des Tierschutzgesetzes (TierSchG, BGBl. I S. 1105) und gemäß den Richtlinien für Tierversuche und Tierhaltung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und der Abteilung für Veterinärangelegenheiten des Landesverwaltungsamts Halle (Saale) durchgeführt. Der Tierversuchsantrag Aktenzeichen: 203.h-42502-2-2-1546 MLU_GÜ - "Etablierung neuer Therapiemöglichkeiten zur Behandlung pädiatrischer Leukämien" wurde durch die zuständige Behörde genehmigt. Die Tiere wurden während der Versuche täglich überwacht und deren Aktivität mithilfe einer Aktivitätstabelle (Anlage 1) in 6 verschiedene Stufen eingeteilt. Hierbei wurde auf die Kriterien verminderte Aktivität, Gewichtsverlust, unzureichende Nahrungsaufnahme, stumpfes Fell geachtet. Zeigte ein Versuchstier einen Aktivitätsscore von 3, wurde es intensiver überwacht. Zeigte ein Versuchstier, unabhängig aus welcher Versuchsgruppe, ein Verhalten aus Score 4b (Übergang Score 4 zu Score 5), wurde dieses Tier umgehend aus dem Versuch genommen (Anlagen, Tab. Aktivitätseinteilung der Mäuse). Die Tötung erfolgte durch Betäubung und anschließende zervikale Dislokation. ABT-263 (Adooq Bioscience) wurde in 10% EtOH, 30% PEG400 (Carl Roth), 60% Phosal 50 PG (Fisher Scientific) gelöst. Gemäß der GV-SOLAS Richtlinien wurden immundefiziente, subletal bestrahlte (Dosis: 250 cGy) 8 - 11 Wochen alte, ca. 20g schwere, MISTRG (Rongvaux, Willinger et al. 2014, Wunderlich and Mulloy 2016) - und NSG-Mäuse mit $1,5 \times 10^6$ PDX-Zellen in PBS Suspension pro Maus, in einem Volumen von maximal 150 µl (10 ml/kg) transplantiert. Die subletale Dosis bewirkt eine Konditionierung des Knochenmarks, was das Engraftment der transplantierten Zellen erhöht. Die transplantierten Zellen wurden vor Transplantation auf Pathogene untersucht und/oder von der DSMZ gekauft. Die Transplantation erfolgte durch Injektion der Leukämiezellen über die Schwanzvene bei Immobilisation der Mäuse mittels eines Restrainers. Es wurden so 4 KMT2Ar (NSG Mäuse) und 4 ML-DS (MISTRG Mäuse) Subtypen in jeweils 16 Versuchstiere transplantiert. Somit bildeten sich 8 verschiedene PDX-Versuchsgruppen mit insgesamt 128 Mäusen. Über das Trinkwasser erhielten die Mäuse bis 3 Wochen nach Transplantation eine bakterielle Infektionsprophylaxe mit Ciprofloxacin 0,05 mg/ml. Die Aktivität und Mobilität der Mäuse wurde in den ersten 5 Tagen täglich kontrolliert, im weiteren Zeitraum des Engraftments wurden die Mäuse dreimal wöchentlich kontrolliert. Die Krankheitsentstehung zeigt sich durch Veränderung des äußeren Erscheinungsbilds und im Allgemeinverhalten. Außerdem führten wir eine retroorbitale Blutentnahme zwei Wochen nach

Transplantation durch, welche durchflusszytometrisch ausgewertet wurde. Eine weitere Blutentnahme erfolgte frühestens nach weiteren 28 Tagen und wurde an dem jeweils anderen Auge vorgenommen. Hierzu wurden die Mäuse maximal 2 Minuten lang fixiert. Für die durchflusszytometrische Auswertung verwendeten wir monoklonale Ratten-Anti-Maus-CD45-Antikörper (mAb) (BD Bioscience), APC-Maus-Anti-Human-CD45RA-mAb (BD Bioscience), CD34-mAb (581) PE-Cyanin 5,5 (BD Bioscience), APC-H7-Maus-Anti-Human und CD3-Klon SK7 mAb (BD Bioscience). Sobald die Manifestation der Krankheit durch Detektion humaner Zellen in der Durchflusszytometrie bestätigt war, wurden die PDX Versuchsgruppen in jeweils 8 Mäuse aufgeteilt. Diese bildeten Interventions- und Kontrollgruppe. Diese Untergruppen wurden für die Dauer von 21 Tagen täglich mit ABT-263 (80 mg/kg Körpergewicht, maximales Volumen 5 ml/kg Körpergewicht) oder Vehikel (10% EtOH, 30% PEG400, 60% Phosal 50 PG) über eine orale Schlundsonde (Gavage über eine flexible Gavage Nadel aus Polypropylen und weicher Spitze aus Silicon, 20-G) behandelt (Tse, Shoemaker et al. 2008, Faber, Farago et al. 2015). Die Mäuse wurden hierzu maximal 2 Minuten lang fixiert. Nach Ablauf der 21-tägigen Behandlung wurden 3 von 8 Mäusen aus jeder Untergruppe (ABT-263 und Vehikel) für die Endpunktanalyse aus dem Experiment genommen. Die verbleibenden 5 Mäuse pro Untergruppe blieben ohne eine weitere Behandlung für die Überlebensanalyse mit der Kaplan-Meier-Methode im Versuch und wurden weiter überwacht.

Um therapieinduzierte Unterschiede in makroskopischen und mikroskopischen Parametern zu dokumentieren, wurden verschiedene Tests durchgeführt. Gewicht und Größe der Milz der Versuchstiere wurden unmittelbar nach der Tötung und Präparation gemessen und dokumentiert. Die Konzentration von Leukämiezellen in Knochenmark, Milz und Leber wurde durchflusszytometrisch analysiert. Hierzu verwendeten wir Anti-Human-CD3-Antikörper (APC), Anti-Maus-Antikörper (APC), CD45-Antikörper (APC), Anti-Human-CD45-Antikörper (APC), Anti-Human-CD34-Antikörper.

Der Todeszeitpunkt wurde dokumentiert und mithilfe der Kaplan-Meier Methode wurden Placebo- und Behandlungsgruppe verglichen. Die gewonnenen Daten wurden mit der GraphPad Prism 9 Software graphisch veranschaulicht. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit einem Log-Rank-Test.

6.9 mRNA-Sequenzierung

Bei den Tierversuchen gewonnene Proben der Placebo- und Behandlungsgruppe von KMT2Ar #1 + #4 und ML-DS #2 + #3 wurden zur mRNA-Sequenzierung an das Max-Planck-Institut, Berlin, Deutschland geschickt. Die Ergebnisse der mRNA Sequenzierungen wurden in Microsoft Excel nach den relevanten Genen der BCL-2 Familie sortiert und für jeden Subtyp (KMT2Ar #1 und #4, sowie ML-DS #2 und #3) individuell logarithmisch formatiert. Diese Ergebnisse wurden

mit der GraphPad Prism 9 Software weiterverarbeitet. Hierbei wurde eine vergleichende Heatmap erstellt und analysiert. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit einem ungepaarten t-Test.

7 Ergebnisse

7.1 Die *in vitro* Wirksamkeit von ABT-263 (Navitoclax) variiert zwischen AML-Subtypen und korreliert mit der BCL-2 Expression.

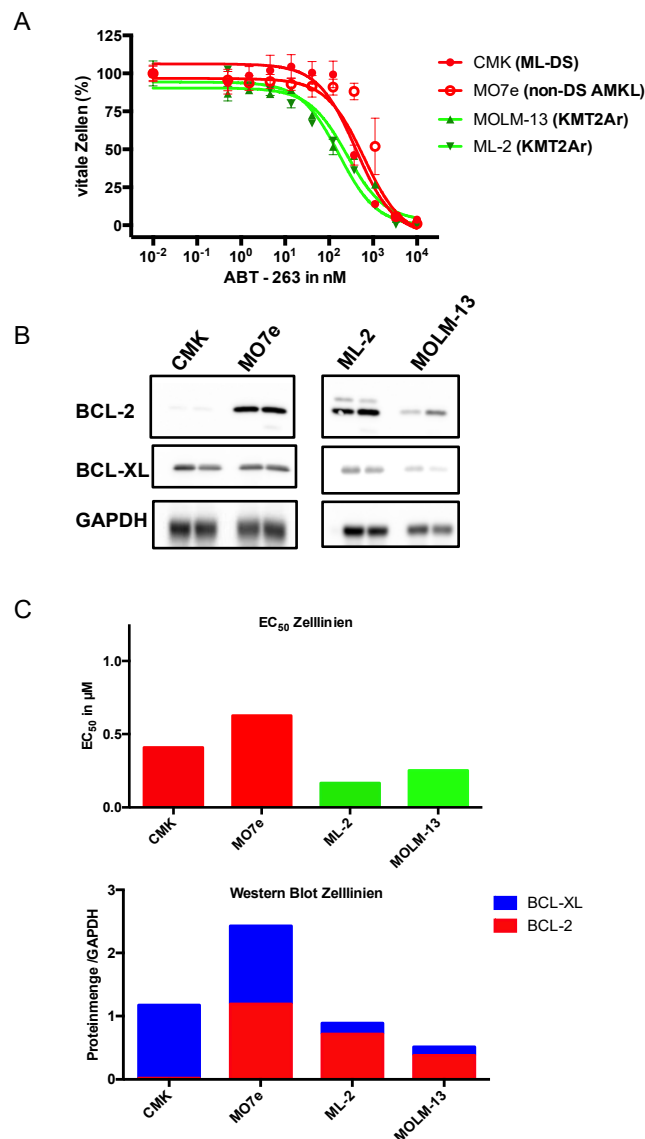


Abbildung 2: ABT-263 induziert eine dosisabhängige apoptotische Wirkung in Zelllinien.

(A) Dosis-Wirkungs-Assays demonstrieren die Anzahl vitaler Zellen im Verhältnis zur Dosis ABT-263 ($n=3$ pro Zelllinie), (B) Semiquantitativer Vergleich der Proteinlevel von BCL-2 und BCL-XL der in A getesteten Zelllinien, ($n = 3$ pro Zelllinie) (C) Balkendiagramme der EC_{50} Werte aus A und der quantifizierten Proteinbanden aus B. Die Pixeldichte der BCL-2/BCL-XL Proteinbanden wurde mit der ImageJ Software quantifiziert und ins Verhältnis zur Pixeldichte der GAPDH Banden gesetzt.

Die Empfindlichkeit von vier verschiedenen AML-Zelllinien und Patientenzellen gegenüber ABT-263 wurde durch einen Zell-Lumineszenz-Viabilitäts-Test bewertet, ab einer EC_{50} von 1 µM wurde die Probe als *non responder* (NR) eingestuft. Zunächst wurden die Zelllinien untersucht (Abbildung 2). Hier zeigten sich CMK (ML-DS) Zellen als sensibel. Ebenso verhielten sich MO7e (AMKL), MOLM-13 (KMT2Ar), ML-2 (KMT2Ar). Diese Ergebnisse zeigten, dass ABT-263 sowohl bei megakaryoblastischen Zelllinien mit und ohne DS-Assoziation, als auch bei KMT2A Aberration therapeutisches Potenzial besitzt. Mit Ausnahme von CMK zeigten alle Zelllinien eine deutliche BCL-2 Expression. Die KMT2Ar Zelllinien zeigten niedrigere EC_{50} Werte und geringere BCL-XL Expressionen als die megakaryoblastischen Zelllinien. Im Anschluss an die Prüfung der Zelllinien galt es, das Ansprechen der Patientenzellen zu evaluieren. Die Patientenzellen wurden für 72 Stunden mit ABT-263 inkubiert und deren Vitalität anschließend ebenfalls mittels eines Zell-Lumineszenz-Viabilitäts-Tests bewertet. Wir prüften insgesamt 4 KMT2Ar und 4 ML-DS tertiäre Patientenzellen (Abbildung 3). Hierbei

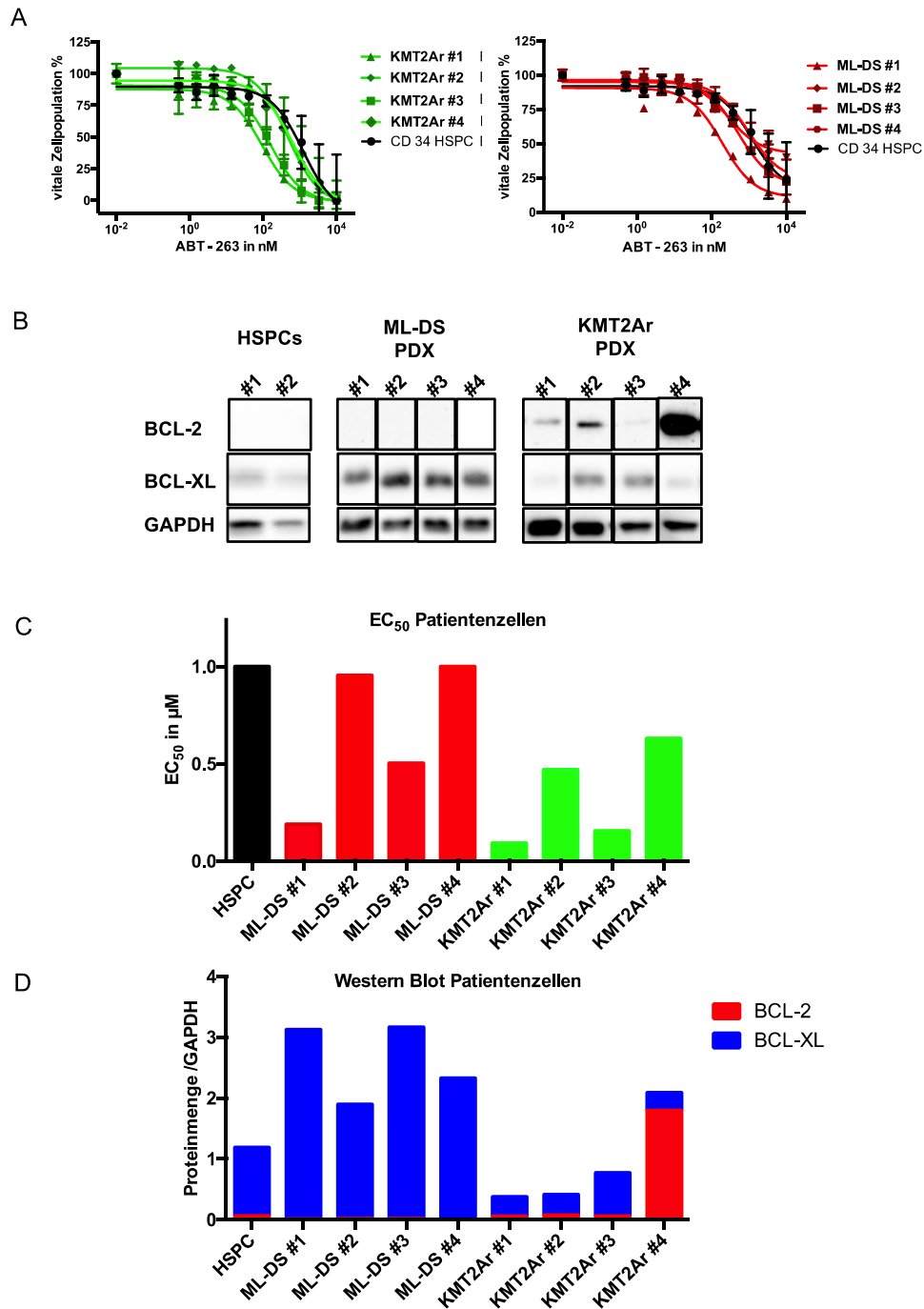


Abbildung 3: Die Effektivität von ABT-263 zeigt eine Korrelation mit der BCL-2 Expression.

(A) Dosis-Wirkungs-Assays der PDX Untergruppen KMT2Ar und ML-DS. (n=3 pro Zelltyp), (B) Semiquantitativer Vergleich der Proteinlevel von BCL-2 und BCL-XL in PDX Subtypen. (n=3 pro Zelltyp) (C) Balkendiagramm der EC_{50} Werte aus A. Wir definierten das Nichtansprechen der Zellen als $EC_{50} > 1 \mu M$. Werte über dieser Grenze wurden zur besseren Veranschaulichung auf $1 \mu M$ begrenzt. (D) Balkendiagramm der quantifizierten Proteinbanden aus B. Die Pixeldichte der BCL-2/BCL-XL Proteinbanden wurde mit der ImageJ Software quantifiziert und ins Verhältnis zur Pixeldichte der GAPDH Banden gesetzt.

zeigte sich eine deutliche Differenzierung der Sensibilität gegenüber ABT-263, es wurde eine subtypspezifische Reaktion beobachtet: Während sich bei KMT2Ar Patientenzellen im Vergleich zu HSPC eine höhere Zytotoxizität zeigte, hatten ML-DS Patientenzellen einen hohen $EC_{50} > 1 \mu M$, was wir als therapierefraktär werteten. Keine der KMT2Ar Patientenzellen erreichte den EC_{50} Grenzwert von $1 \mu M$, während die Hälfte der ML-DS Patientenzellen und HSPC diesen überschritten. Wir vermuteten eine höhere Expression der Zielproteine BCL-2 und -XL in den Zellen, welche eine erhöhte Zytotoxizität zeigten (Del Gaizo Moore, Schlis et al. 2008, Merino, Khaw et al. 2012). Daher überprüften wir das Expressionsprofil von Zelllinien und Patientenzellen unter der Verwendung von Western-Blot-Assays (Abbildung 2 und 3). Diese zeigten eine große Variation der Proteinspiegel von BCL-2 und BCL-XL zwischen den leukämischen Untergruppen. Bei den Zelllinien war der EC_{50} in den Dosis-Wirkungs-Assays $< 1 \mu M$, die BCL-2 Proteinspiegel waren bei KMT2A und AMKL Zelllinien erhöht. Eine Ausnahme bildeten CMK Zellen, welche einen niedrigen BCL-2 und einen hohen BCL-XL Proteinspiegel aufwiesen. Es fiel jedoch auf, dass der BCL-XL Spiegel in den ML-DS und AMKL Zelllinien deutlich höher war als bei KMT2Ar. Bei Analyse der Western Blots der Patientenzellen fiel auf, dass die untersuchten ML-DS-Zellen praktisch kein BCL-2 aufwiesen, jedoch eine hohe Konzentration von BCL-XL. In Patientenzellen mit *KMT2A* Aberration war BCL-2 jedoch stark oder sehr stark exprimiert (Abbildung 3). BCL-XL zeigte sich besonders bei ML-DS sehr stark ausgeprägt, KMT2Ar Zellen wiesen deutlich niedrigere Spiegel auf. In Zusammenschau der Befunde korrelierte eine hohe oder deutliche Expression von BCL-2 bei Zelllinien und Patientenzellen mit einer stärkeren zytotoxischen Reaktion im Zytotoxizitäts-Assay (Abbildung 2 und 3). Dieser Effekt schien jedoch von der BCL-XL Expression weitestgehend unbeeinflusst zu sein. Dies war unerwartet, da ABT-263 nicht nur BCL-2, sondern auch BCL-XL inhibiert (Merino, Khaw et al. 2012). Eine geringe BCL-2- und eine hohe BCL-XL-Expression wurde vor allem in refraktären Patientenzellen, insbesondere bei ML-DS, beobachtet. Im Verhältnis zu den EC_{50} Werten des Dosis-Wirkungs Assays zeigt sich, dass erhöhte BCL-2 Konzentrationen in der Regel mit deutlich niedrigeren EC_{50} Werten korrelierten und eine hohe BCL-XL Expression mit erhöhten EC_{50} Werten einherging (Abbildung 3). Diese Befunde suggerierten eine herausragende Rolle von BCL-2 bei der Apoptose Induktion durch ABT-263, trotz des BCL-2/BCL-XL spezifischen Wirkungsprofils. Die hohen BCL-XL Spiegel bei ML-DS Zellen könnten sich dadurch erklären lassen, dass diese meist einen megakaryoblastischen Phänotyp haben. In der Thrombopoese ist BCL-XL in Megakaryoblasten physiologisch, durch Thrombopoetin vermittelt, erhöht (Kozuma, Kojima et al. 2007). Auch für das Überleben von Thrombozyten spielt BCL-2 eine untergeordnete und BCL-XL eine essenzielle Rolle (Debrincat, Pleines et al. 2015). Die Aussagekraft der Ergebnisse aus den Patientenzellen bewerteten wir deutlich größer als die der Zelllinien, da diese Krebszellen naturgemäß weniger Mutationen durch lange Kultivierung aufweisen und daher ähnlicher als „natürliche“ Leukämiezellen reagieren.

7.2 Die Expression von BCL-2 und BCL-XL sichert Viabilität von AML Zellen

Die Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Untersuchungen und Western Blots ließen vermuten, dass die Expression von BCL-2 mit der Empfindlichkeit der betreffenden Zelllinie oder der betreffenden Patientenzellen korreliert. Um diese Ergebnisse zu validieren, prüften wir mithilfe eines kompetitiven shRNA Knockdown Experiments die vitale Abhängigkeit der Zellen von der Expression von BCL-2 und BCL-XL. Durch die Behandlung von Zellen mittels einer shRNA ist es möglich, gezielt Gene in den Proben durch RNA-Interferenz auszuschalten, um die Effekte in Abwesenheit dieser Gene und deren Produkte zu evaluieren. Wir testeten die Vitalität der shRNA transduzierten Zellpopulationen im Vergleich zu Kontrollpopulationen mittels Durchflusszytometrie. Die getesteten Zelllinien MO7e und ML-2 wurden beim Knockdown über den Verlauf von 12 Tagen, in Abhängigkeit der Expression von BCL-2 und BCL-XL (Abbildung 2), drastisch dezimiert, während die Populationen der Kontrollen konstant blieben (Abbildung 4). Eine geringe Expression korrelierte mit geringer Einschränkung durch den shRNA Knockdown. So führte der BCL-2 Knockdown in ML-2 (BCL-2 hoch, BCL-XL niedrig) und MO7e (BCL-2 hoch, BCL-XL hoch) zu einer signifikanten Verringerung der Zellzahl, während das Knockdown von BCL-XL bei ML-2 keinen Effekt zeigte. Bei MO7e führte entsprechend der hohen Expression auch das Knockdown von BCL-XL zu einer signifikanten Verringerung der Zellpopulation. Die Ergebnisse des Annexin V Assays (Abbildung 4) zeigten sowohl bei MO7e als auch bei ML-2 nach einer 48-stündigen Behandlung mit 0,5 μ M ABT-263 eine Verdopplung des Anteils der apoptotischen Zellen. Eine hohe Effektivität korrelierte mit einer vermehrten Expression der jeweiligen Proteine (Abbildung 2). Im Anschluss wiederholten wir das Experiment mit Patientenzellen. Hierbei zeigte sich, dass auch bei Patientenzellen die Expression von BCL-2 und BCL-XL (Abbildung 3) mit der Effektivität der shRNA Behandlung korrelierte (Abbildung 4). So verringerte sich die Population von ML-DS Patientenzellen vor allem durch das Knockdown von BCL-XL signifikant. Auch die KMT2Ar Patientenzellen verhielten sich gemäß der Expression von BCL-2 und BCL-XL. Entweder waren sie auf beide Knockdowns sensibel oder – bei geringer BCL-XL-Expression – refraktär gegenüber einem BCL-XL Knockdown. Um einen Hinweis zu erhalten, ob sich dieser Effekt auch durch die Inhibition mit ABT-263 reproduzieren lässt, führten wir auch bei den Patientenzellen ein Annexin V Assay durch. Nach 48h Inkubationszeit mit ABT-263 stieg der im Annexin V Assay gemessene Anteil der apoptotischen Zellen bei allen Subtypen deutlich an (Abbildung 4). Während die Anzahl der apoptotischen HSPC im Vergleich nur geringfügig stieg, waren KMT2Ar Patientenzellen gegenüber dem pro-apoptotischen Effekt besonders empfindlich, der Anteil apoptotischer Zellen verdoppelte sich durch die Inkubation mit ABT-263.

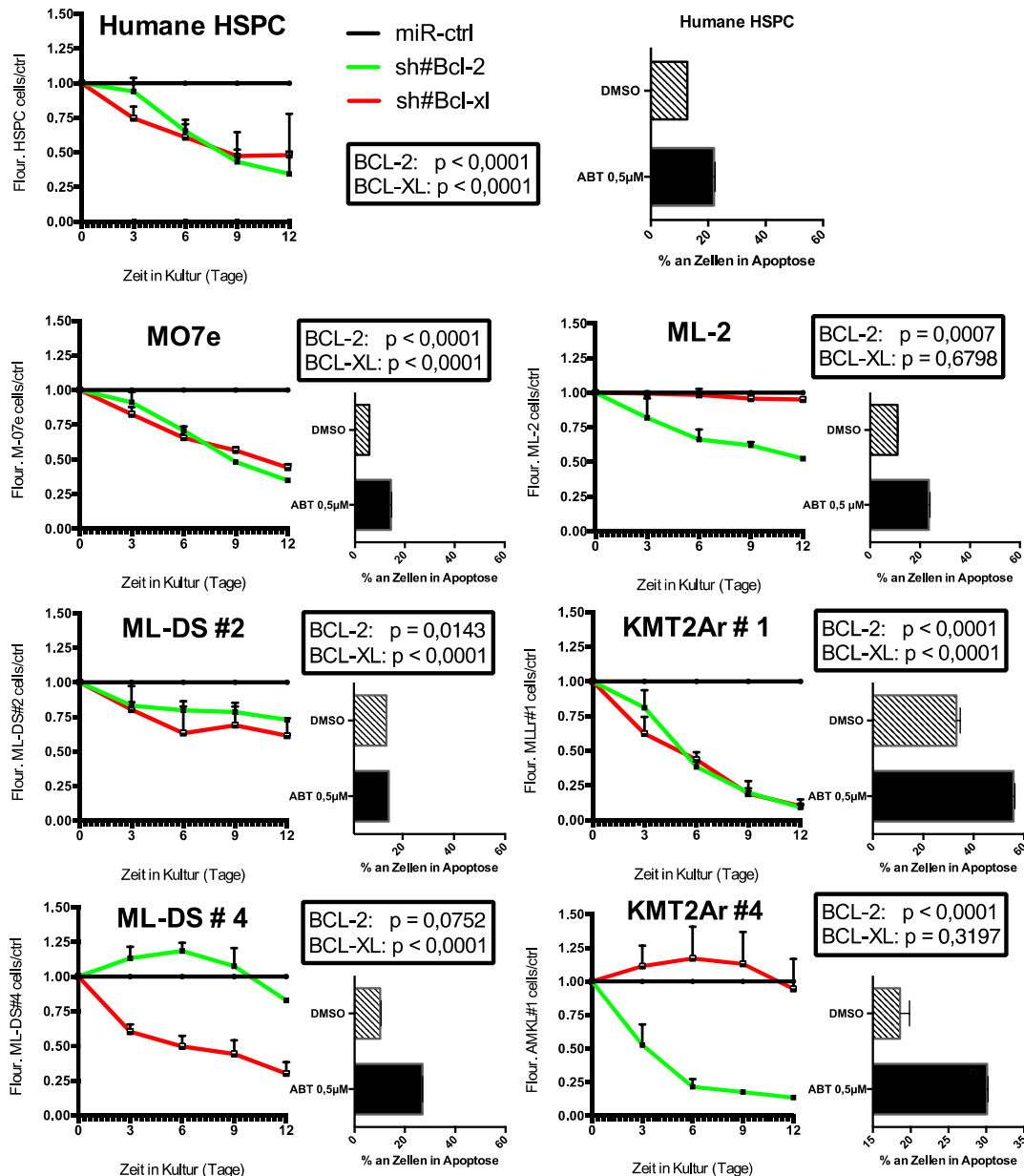


Abbildung 4: shRNA Knockdown von BCL-2 und BCL-XL hemmt die Proliferation von Zelllinien und Patientenzellen. Der Anteil apoptotischer Zellen wird durch ABT-263 erhöht.

shRNA Knockdown und Annexin V Assay Ergebnisse. Kompetitives Knockdown von BCL-2 und BCL-XL in Zelllinien, sowie PDX und HSPC Zellen. ($n = 3$ pro Subtyp). Dem gegenübergestellt ein Balkendiagramm der durch Annexin V markierten Zellen in der Durchflusszytometrie nach 48 h Inkubation mit ABT-263 in einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$. ($n = 3$ pro Subtyp)

Trotz Unempfindlichkeit der ML-DS Patientenzellen im Dosis-Wirkungs Assay stieg auch hier der Anteil apoptotischer Zellen durch die Behandlung mit ABT-263 an, jedoch geringer als bei KMT2Ar Patientenzellen. Aus den Ergebnissen leiteten wir ab, dass ABT-263 sowohl bei ML-DS und non-DS AMKL, als auch bei *KMT2A* Aberration die Fähigkeit zur Apoptose-Induktion hat. Dieser Effekt scheint jedoch zwischen den Untergruppen ungleich verteilt zu sein. Die

Möglichkeiten hierfür sind mannigfaltig und umfassen Kompensationsmechanismen, Zellteilungsgeschwindigkeit, Mutation und viele mehr. Es ist jedoch wichtig hier die geringere Sensibilität der HSPC Zellen hervorzuheben, da die Reduktion der Zahl von humanen Stammzellen durch die Inhibition von BCL-2 und BCL-XL eine potenziell therapielimitierende Nebenwirkung bedeutet. In der klinischen Anwendung würde sich so die therapeutische Breite reduzieren. Bei dem Großteil der Patientenzellen, sowie den Zelllinien entspricht die Reaktion auf den shRNA Knockdown jedoch den Ergebnissen der zuvor beschriebenen Experimente.

7.3 ABT-263 reduziert die Leukämielast und verlängert das Überleben von AMKL- und KMT2Ar-PDX transplantierten Mäusen

Die Fähigkeit zur Eradikation von leukämischen Blasten durch ABT-263 *in vivo* wurde bei kindlicher ALL bereits gut untersucht, wobei das therapeutische Ansprechen durch vorherige *in vitro* Zytotoxizitätstests vorhersagbar war (Lock, Carol et al. 2008, Suryani, Carol et al. 2014). Um zu testen, ob dies auch für pädiatrische AML im Rahmen unseres Versuchsmodells gilt, haben wir ein PDX-Mausmodell erstellt (Abbildung 5).

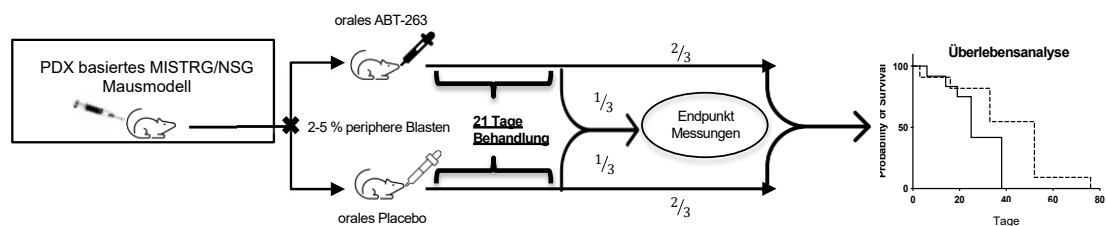


Abbildung 5: Versuchsaufbau zur *in vivo* Testung mittels eines PDX-basierten Mausmodells

8 verschiedene AML PDX Subtypen wurden in NSG- und MISTRG-Mäuse transplantiert und diese für 21 Tage mit ABT-263 (80 mg/kg Körpergewicht) oder Placebo behandelt. Am Ende der 21 Tage verblieben 5/8 Mäuse im Versuch, während 3/8 Mäuse zur Untersuchung von therapiebedingten Makroskopischen und Mikroskopischen Unterschieden aus dem Versuch genommen wurden.

Zu Beginn, während und nach Ende der Therapie erfolgte eine retroorbitale Blutentnahme, wobei die Unterschiede in der Anzahl zirkulierender Leukämiezellen mithilfe der Durchflusszytometrie gemessen wurden. Hierbei zeigte sich, dass ABT-263 vor allem die Zahl der im Blut zirkulierenden KMT2Ar Patientenzellen effektiv reduzieren konnte (Abbildung 7). Teilweise war dieser Effekt auch bei ML-DS PDX zu beobachten. Vor allem bei KMT2Ar #1, #2 und #4 war dies stark ausgeprägt. Der Anteil der Blasten zu den restlichen Blutzellen variierte zwischen den Subtypen, ebenso die Korrelation von vaskulärer und medullärer Leukämielast der Versuchstiere. Unterschiede im Gewicht der Milz zwischen Placebo- und Behandlungsgruppe waren bei allen getesteten KMT2Ar Patientenzellen vorhanden (Abbildung 6). Dieser Effekt ließ sich bei ML-

DS, mit der Ausnahme von ML-DS #1, nicht beobachten. Signifikante Unterschiede zeigten sich hier bei KMT2Ar #1 ($p = 0,0317$), wo das Gewicht der Milz in der Behandlungsgruppe um den Faktor 3,4 geringer war als in der Kontrollgruppe, sowie bei KMT2Ar #4, wo mit einem 8,5-fach verringerten Gewicht ($p = 0,0012$) dieser Effekt noch stärker zu beobachten war. Eine leicht signifikante Verringerung des Gewichts der Milz um den Faktor 1,96 zeigte sich auch bei ML-DS #1 ($p = 0,0472$). Der Anteil der Leukämiezellen im Knochenmark der Mäuse korrelierte größtenteils mit dem Gewicht der Milz (Abbildungen 6 und 7). So fiel auch die medulläre Verringerung der Leukämie last bei KMT2Ar #1 und #4 besonders deutlich aus. ML-DS #1 zeigte ebenfalls

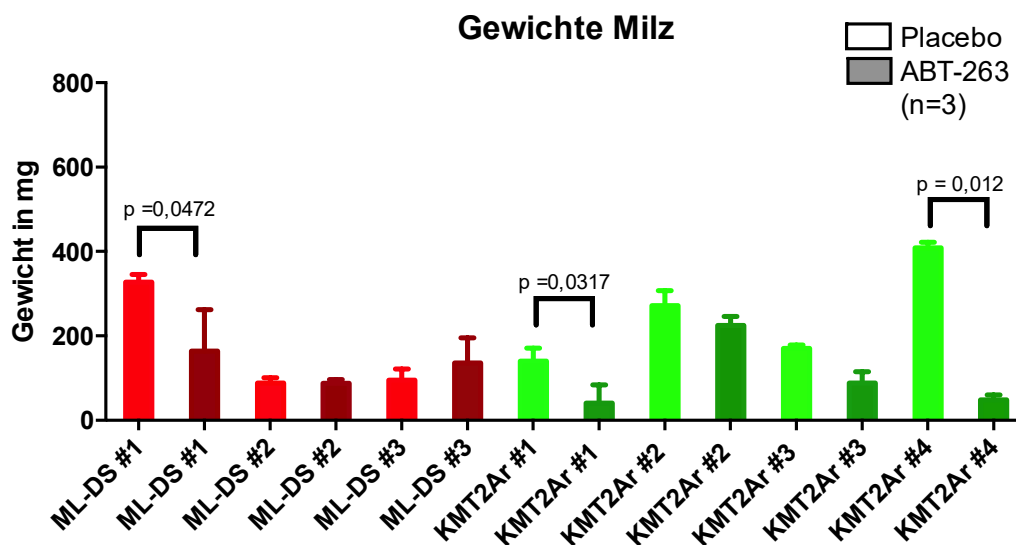


Abbildung 6: Die Gewichte der Milz nach Behandlung mit ABT-263 über 21 Tage unterscheiden sich deutlich zwischen den verschiedenen Subtypen.

Balkendiagramm des Milzgewichts der Versuchstiere nach 21 Tagen oraler Behandlung mit ABT-263 (KMT2Ar #1: $p = 0,0317$; KMT2Ar #4: $p = 0,0012$; ML-DS #1: $p = 0,0453$).

medulläre Reduktion, so auch bei ML-DS #2 und #3, hier war jedoch keine Korrelation mit dem Gewicht der Milz zu beobachten. Abbildung 7 zeigt den vaskulären und medullären Anteil an leukämischen Blasten nach 21 Tagen Behandlung. So führte die Behandlung mit ABT-263 bei allen KMT2Ar-transplantierten Tieren zu einer signifikanten Reduktion der Leukämiezellen im Knochenmark. Einen besonders hervorzuhebenden Effekt beobachteten wir bei KMT2Ar #1 und KMT2Ar #4, bei denen es zu einer 8,7-fachen ($p < 0,0001$) bzw. 2-fachen ($p < 0,0001$) Reduktion der Leukämiezellen im Knochenmark im Vergleich zur Kontrollgruppe kam. Auch bei ML-DS kam es bei 3 von 4 untersuchten Subtypen zu einer signifikanten Reduktion der medullären Leukämie last. Dieser Effekt war jedoch insgesamt schwächer ausgeprägt als bei KMT2Ar-transplantierten Tieren. Lediglich bei ML-DS #3 wiesen wir einen besonders deutlichen

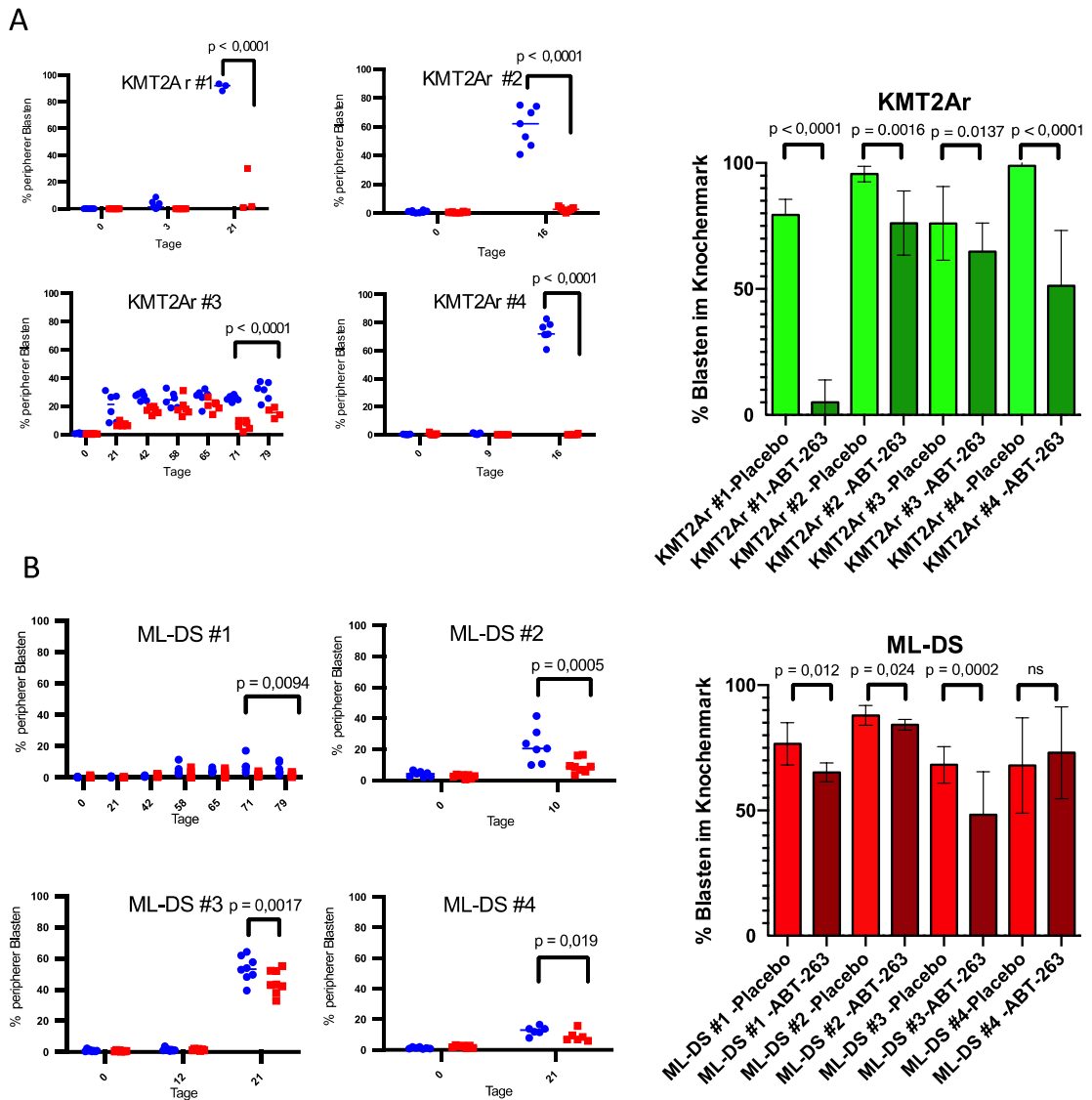


Abbildung 7: ABT-263 bewirkt eine drastische Verringerung der Leukämiezellen im peripheren Blut und Knochenmark der Versuchstiere.

Konzentration der leukämischen Blasten in Blutkreislauf und Knochenmark. Durchflusszytometrische Analyse (n=3 pro Subtyp) des relativen Anteils leukämischer Blasten in Blutproben über den Behandlungszeitraum mit ABT-263, sowie des relativen Anteils von leukämischen Blasten im Knochenmark bei (A) PDX mit *KMT2A* Aberration und (B) ML-DS PDX (KMT2Ar #1: $p < 0,0001$; (KMT2Ar #2: $p = 0,0016$; KMT2Ar #3: $p = 0,0137$; KMT2Ar #4: $p < 0,0001$; ML-DS #1: $p = 0,0127$; ML-DS # 2: $p = 0,0238$; ML-DS # 3: $p = 0,0002$; ML-DS # 4: $p = 0,5128$).

antileukämischen Effekt nach (Reduktion um den Faktor 1,19; $p = 0,0002$). Ebenfalls konnten wir zeigen, dass durch die 21-tägige Behandlung mit ABT-263 sowohl bei ML-DS, als auch bei KMT2Ar-transplantierten Tieren der Anteil an Blasten signifikant reduziert werden konnte. Bei KMT2Ar-transplantierten Tieren war dies besonders eindrücklich und hoch signifikant ($p < 0,0001$) (Abbildung 7). Diese scheinbare Refraktarität von ML-DS auf ABT-263 war bereits zuvor *in vitro* zu beobachten. Beim Vergleich zwischen dem medullären und vaskulären Anteilen

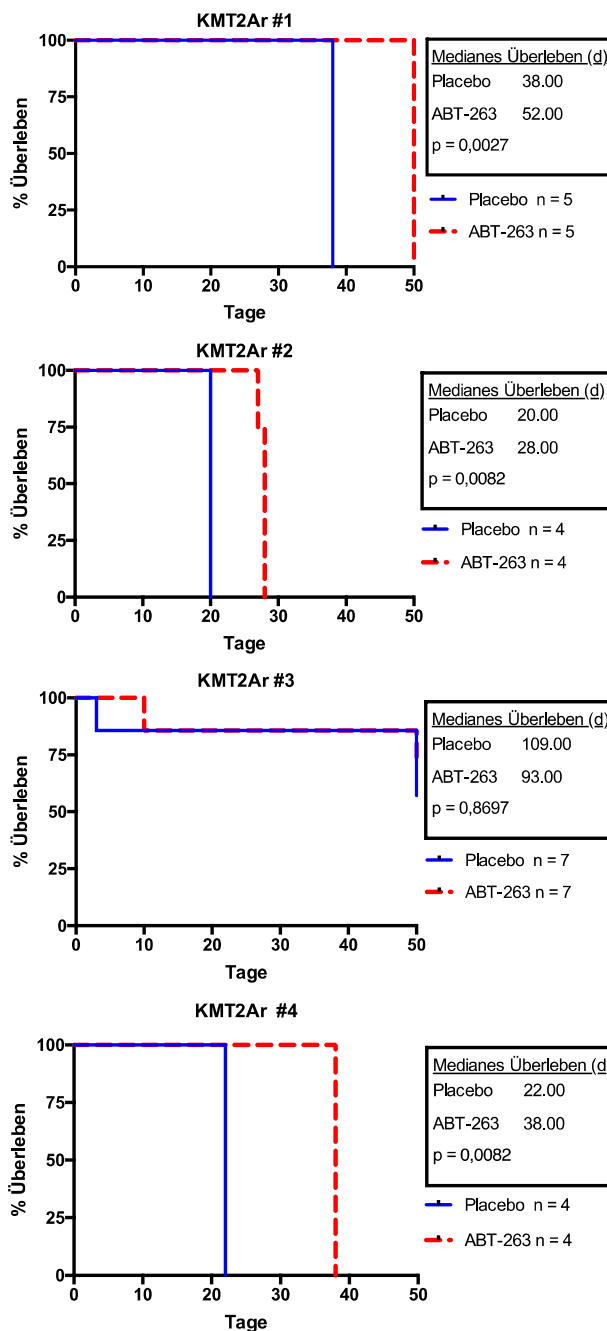


Abbildung 8: Bei KMT2Ar zeigt sich ein signifikanter Überlebensvorteil.

Kaplan-Meier Analyse der Überlebenszeiten der Versuchstiere. Es zeigt sich in der vergleichenden Berechnung der Kurven mittels Log-Rank Test bei KMT2Ar #1, #2 und #4 ein signifikanter Unterschied in den Überlebenszeiten. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Zeitraum auf 50 Tage begrenzt.

Durchschnitt 16 Tage länger ($p = 0,0082$). KMT2Ar #2-transplantierte Tiere profitierten mit 8 Tagen ($p = 0,0082$) von einem geringeren, jedoch noch immer signifikanten Überlebensvorteil.

der Blasten fiel auf, dass die Werte stark variieren. So zeigte sich im Knochenmark häufig ein relativer Blastenanteil im hohen zweistelligen Bereich, während dieser zeitgleich vor allem bei ML-DS transplantierten Tieren im Blut eher im unteren zweistelligen Bereich lag. Somit konnten wir zeigen, dass die Analyse des Anteils der Blasten im Blut zum Therapiemonitoring und der Bestimmung der Krankheitslast bei Versuchstieren nur bedingt geeignet ist. Ein Grund dafür könnte die Mobilisierbarkeit der Zellen vom medullären in den vaskulären Raum sein, der zwischen den verschiedenen Untergruppen variiert. KMT2Ar-transplantierte Tiere zeigten ein gutes Ansprechen auf die Therapie mit ABT-263, was sowohl klinisch beobachtet als auch durchflusszytometrisch nachgewiesen werden konnte.

Wie bereits in den vorigen Versuchsreihen, zeigten auch die Überlebensanalysen die Effektivität von KMT2Ar gegenüber ABT-263 während sich auch hier ML-DS als therapierefraktär erwies (Abbildungen 8 und 9). So überlebten KMT2Ar #1-transplantierte Mäuse im Durchschnitt 14 Tage länger ($p = 0,0027$) (Progressionsfreies Überleben) und KMT2Ar #4-transplantierte Mäuse im

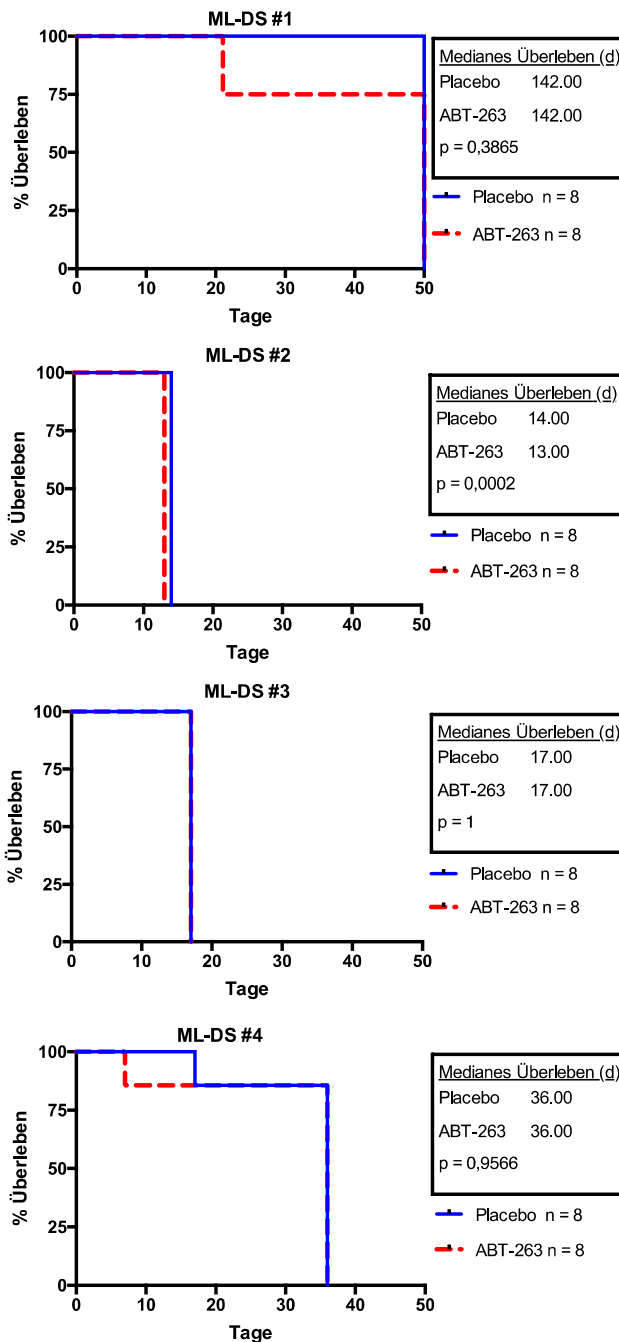


Abbildung 9: ML-DS zeigt sich refraktär gegenüber ABT-263.

Kaplan-Meier Analyse der Überlebenszeiten der Versuchstiere. In der vergleichenden Berechnung der Überlebenskurven mittels Log-Rank Test zeigte sich kein signifikanter Überlebensvorteil. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Zeitraum auf 50 Tage begrenzt.

Hingegen konnte bei keiner der ML-DS-transplantierten Versuchstiere ein Überlebensvorteil festgestellt werden (Abbildung 9). Die Überlebenszeiten zwischen Behandlungs- und Placebogruppe waren hier identisch. Obwohl jedoch zuvor bei den Endpunktanalysen ein antileukämischer Effekt von ABT-263 auf ML-DS in Bezug auf die medulläre und vaskuläre Leukämielast der Versuchstiere nachgewiesen werden konnte, führte dies nicht zu einem verlängerten Überleben. Im Gegenteil mussten zwei der 4 ML-DS Untergruppen vor Beendigung der 21-tägigen Behandlung aufgrund der reduzierten Aktivität der Tiere aus dem Versuch genommen werden, was sich in den Überlebenszeiten widerspiegelt (Abbildung 9). Die analysierten Ergebnisse der Überlebenszeiten bestätigten uns, dass der antileukämische Effekt von ABT-263 bei *KMT2A* Aberration ein gutes Ansprechen zeigt, ML-DS jedoch therapierefraktär ist. Die *in vivo* Ergebnisse der Patientenzellen entsprachen also weitestgehend den zuvor *in vitro* beobachteten Eigenschaften. Wie erwartet reagierte ML-DS nicht auf die Therapie mit ABT-263, während *KMT2Ar* auch *in vivo* sensibel gegenüber ABT-263 war.

7.4 Die apoptotischen Eigenschaften von Zelllinien und Patientenzellen werden durch BH3-Profilierung aufgedeckt – KMT2Ar zeigt ein besonderes Muster

Um eine gezielte Behandlung mit BH3-Mimetika wie ABT-263 anzustreben, ist es nötig die apoptotischen Eigenschaften der Zellen zu identifizieren. Hierzu werden die leukämischen Subtypen vor Beginn der eigentlichen Therapie evaluiert und so ein differenziertes Bild ihrer apoptotischen Signalwege erstellt (Potter and Letai 2016). Ein wichtiger Schritt für die vollständige Erstellung eines solchen Profils ist das BH3 Profiling.

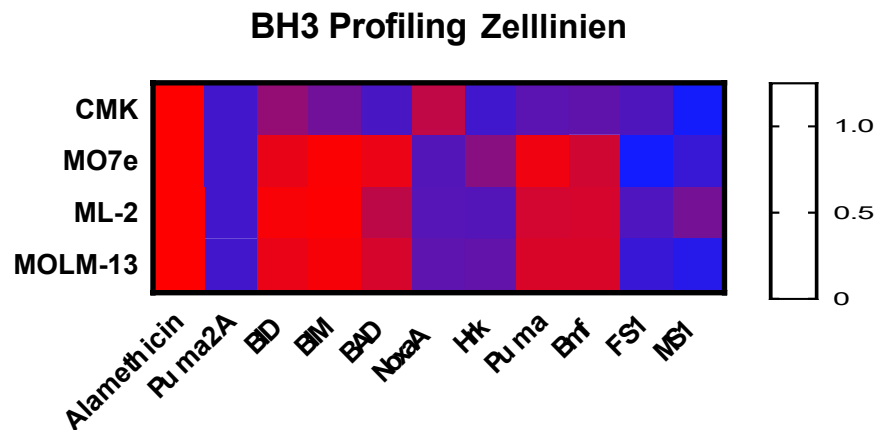


Abbildung 10: BCL-2 ist für die überwiegende Mehrheit der Zelllinien der dominante Überlebensmechanismus der Apoptose.

Heatmap der Polarisation der äußeren mitochondrialen Membran der Versuchszellen (MOM), welche proportional zu der Freisetzung von Cytochrom c ist. Die Werte entsprechen der AUC von unabhängigen BH3 Profiling Experimenten, welche individuell normalisiert und zusammengefasst wurden (n = 3 pro Zelllinie und BH3 Peptid). Die Farbskala spiegelt Polarisation (blau) und Depolarisation (rot) wider.

Die Erstellung eines Profils der apoptotischen Signalwege kann der Therapieansatz individualisiert werden, da auch Rückschlüsse auf die Effektivität von Chemotherapeutika getroffen werden können. Hierzu wird das apoptotische *Priming* der Zellen bestimmt. Dies ist ein Prädiktor für die chemotherapeutische Empfindlichkeit und kann Informationen über die Bereitschaft der Zellen zur Apoptose liefern (Letai, Sorcinelli et al. 2004, Suryani, Carol et al. 2014, Singh, Letai et al. 2019).

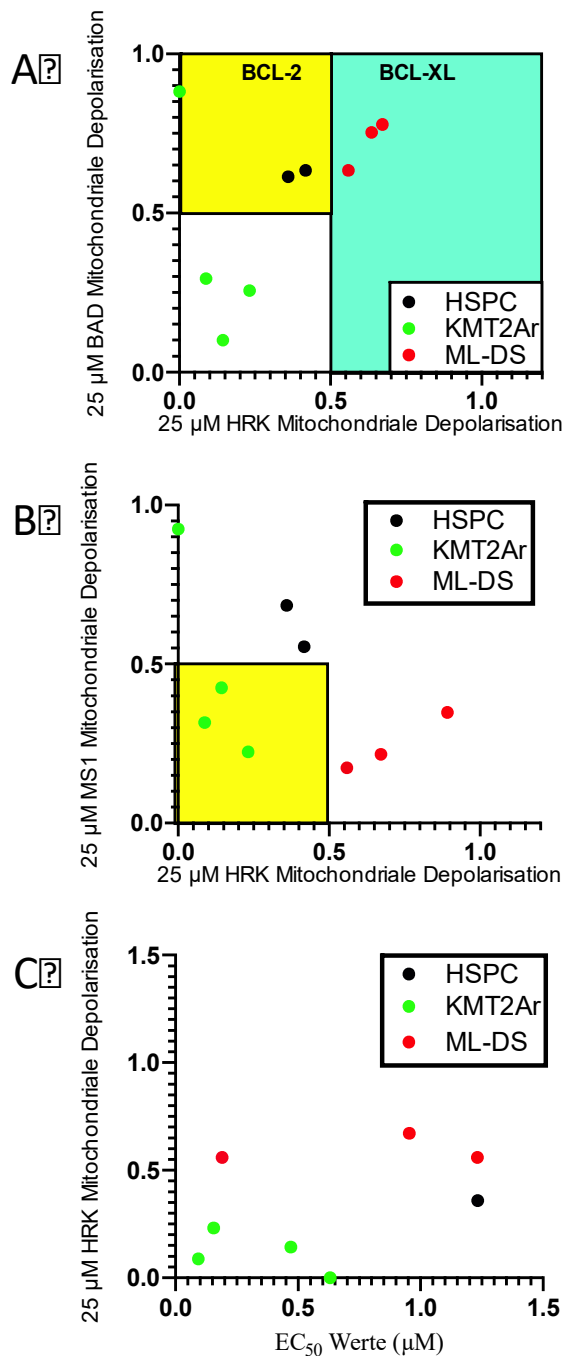


Abbildung 11: BCL-2 Dominanz oder Abwesenheit von Resistenzfaktoren sind therapieentscheidend für die Behandlung von PDX mit ABT-263: BH3 Profiling von 8 verschiedenen PDX Subtypen und HSPC. (A) Cytochrom c Freisetzung durch Exposition zu BAD und HRK (n = 3 pro PDX und BH3 Peptid), (B) Cytochrom c Freisetzung durch Exposition zu MS1 und HRK (n = 3 pro PDX und BH3 Peptid), (C) Cytochrom c Freisetzung durch Exposition zu HRK im Verhältnis zu EC_{50} Wert des Dosis-Wirkungs Assays in μ M (n = 3 pro PDX und BH3 Peptid).

Abbildungen 10 und 11 zeigen das apoptotische *Priming* der Zelllinien und Patientenzellen. Hierzu haben wir die Mitochondrien von 4 Zelllinien und 8 AML-Subtypen der Gruppen KMT2Ar und ML-DS verschiedenen BH3-Peptiden exponiert und mit HSPC verglichen. Beim BH3 Profiling misst man die Polarisation der MOM, welche der Freisetzung von Cytochrom c entspricht. Diese Polarisation haben wir für die Zelllinien in Abbildung 10 in einer Heatmap dargestellt. Es wurde schnell deutlich, dass der Großteil der Zelllinien eine deutliche BCL-2 Dominanz aufwies, da sie eine starke Depolarisation durch BAD erfuhren, während NOXA, welches für MCL-1 spezifisch ist, nur bei CMK eine Depolarisation auslösen konnte. Die *Pansensitizer* PUMA und BMF binden an BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1 gleichermaßen und erlauben hier somit keinen spezifischen Rückschluss (Potter and Letai 2016). Durch die Reaktion auf NOXA lässt sich aber vermuten, dass MCL-1 für CMK Zellen eine bedeutende Rolle spielt, während BCL-2 sonst eine dominante Rolle für das Überleben der anderen Zelllinien spielt. Da das Wirkspektrum von ABT-263 auf BCL-2 und BCL-XL beschränkt ist, interessierte uns vor allem die Rolle, welche diese beiden Proteine in den Patientenzellen spielen. Hierzu haben wir den BAD-HRK-Index (Benito, Godfrey et al. 2015) verwendet (Abbildung 11 A). BAD ist selektiv für BCL-2, BCL-XL und BCL-W, während HRK selektiv für BCL-XL ist (Certo, Del Gaizo Moore et al. 2006).

Indem man die beiden Peptide graphisch gegeneinander darstellt, kann auf eine BCL-2 bzw. BCL-XL Dominanz geschlossen werden. Dies ist vor allem deshalb von Bedeutung, da diese beiden Proteine unter den AML-Untergruppen ungleich exprimiert waren (Abbildung 3). Es zeigte sich, dass ML-DS Blasten auf HRK mit einer Depolarisation der MOM reagierten, was auf eine BCL-XL Dominanz in der Apoptose schließen lässt, passend zu den nachgewiesenen Proteinleveln im Western Blot. HSPCs zeigten keine deutliche HRK Sensibilität, jedoch eine deutliche Depolarisation der MOM durch BAD, was auf eine BCL-2 Dominanz hindeutet. KMT2Ar zeigte keine eindeutige Dominanz eines der beiden Peptide, was bedeuten könnte, dass weder BCL-2 noch BCL-XL bei KMT2Ar Blasten übersteuerte Überlebensfunktionen einnehmen. Jedoch schließt dies nicht aus, dass eine Inhibition jener trotzdem wirksam sein kann. Der MS1-HRK-Index (Abbildung 11 B) verdeutlicht mögliche Resistenzwege gegen eine BCL-2 inhibitorische Behandlung, wobei MS1 spezifisch an MCL-1 und HRK an BCL-XL bindet. KMT2Ar zeigte zuvor meist keine hohen Proteinmengen von BCL-2- oder BCL-XL (Abbildung 3), allerdings *in vitro* und *in vivo* eine deutliche Sensibilität gegenüber ABT-263. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Abwesenheit einer Resistenz gegen die Therapie hier möglicherweise bedeutender ist als das Vorhandensein einer BCL-2 Dominanz (Bhatt, Pioso et al. 2020). Hier veranschaulicht der MS1-HRK Index, dass KMT2Ar bis auf KMT2Ar #4 keine Sensibilität gegenüber MS1 oder HRK BH3 Peptiden zeigt, während ML-DS und HSPC Hinweise auf eine MCL-1 und BCL-XL Dominanz zeigen. MCL-1 könnte also eine Rolle bei der Resistenz gegen ABT-263 spielen. Abbildung 11 C veranschaulicht das Verhältnis der EC₅₀ Werte aus dem Dosis-Wirkungs Assay (Abbildung 3) mit der HRK (BCL-XL) Sensibilität. Dies lässt auf die Bedeutung einer BCL-XL Dominanz für die Effektivität von ABT-263 schließen. Hierbei zeigte sich, dass eine geringe HRK Sensibilität mit einem niedrigen EC₅₀ Wert korrelierte. Es wurde bereits gezeigt, dass ABT-263 in der Lage ist, myeloische Leukämie mit hoher BCL-XL-Expression zu eradizieren (Zhou, Xu et al. 2015). Unsere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass dieser Effekt bei pädiatrischer ML-DS nur in geringem Maße zutrifft.

7.5 mRNA Sequenzierungen zeigten bisher unbekannte Resistenzmuster der AML unter der Therapie mit ABT-263

Wir nutzten Knochenmarkszellen, welche im Rahmen der Endpunkt Untersuchungen den Mäusen entnommen wurden, um mRNA-Sequenzierungen der beiden Versuchsgruppen vorzunehmen, mit dem Ziel die beobachtete Resistenz aller ML-DS Patientenzellen zu erklären, sowie Mechanismen, die zur Adaptation von KMT2Ar führten. Die hieraus gewonnenen Daten sind in Abbildung 12 und 13 dargestellt. Wir untersuchten exemplarisch jeweils 2 verschiedene Patientenzellen von KMT2Ar und ML-DS im Vergleich zu HSPC. Bei den Proben aus der Placebo Gruppe fiel uns auf, dass außer bei KMT2Ar #4 kein weiterer

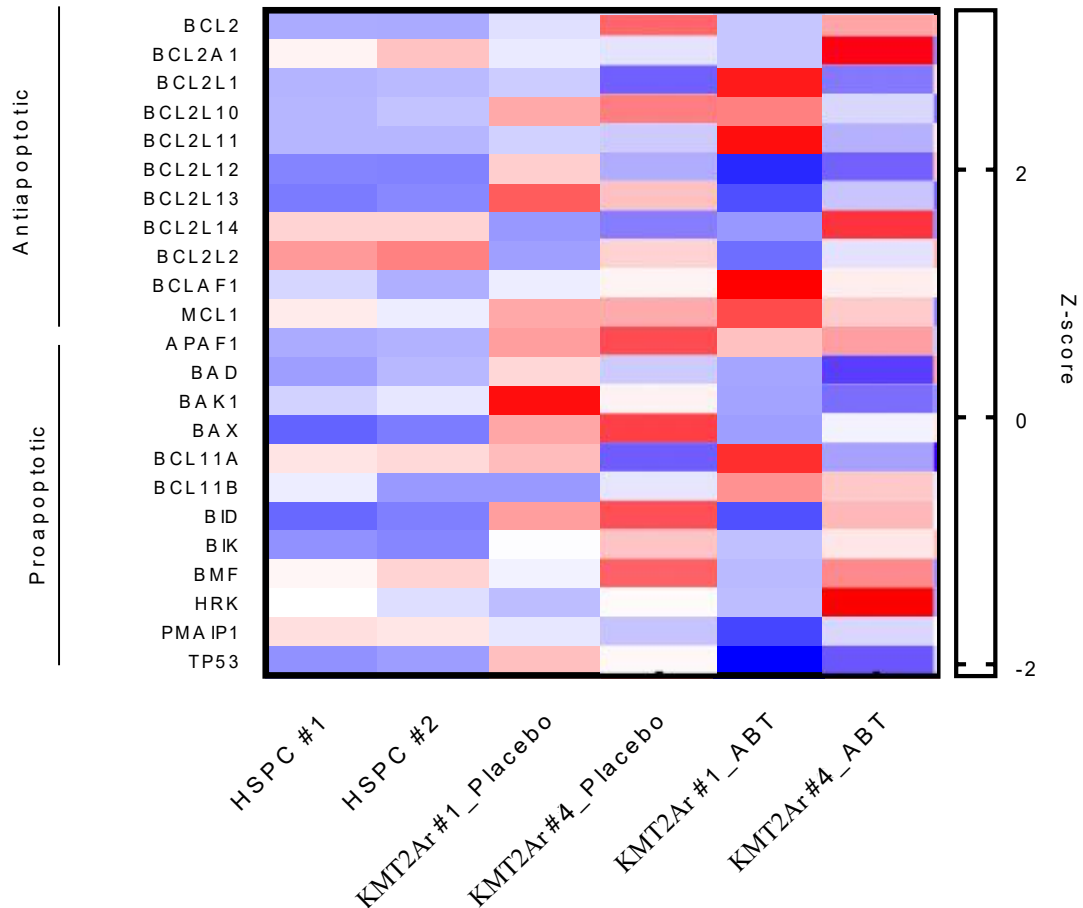


Abbildung 12: mRNA Sequenzierung des Knochenmarks der Versuchsmäuse von KMT2Ar #1 und #4 enthüllt Resistenzmuster:

Heatmap der mRNA Sequenzierung von Knochenmarkszellen der Endpunkt-Mäuse von KMT2Ar #1 und #4. Die Werte wurden zur besseren Anschaulichkeit von Veränderungen logarithmisch formatiert. Eine Farbskala veranschaulicht das quantitative Expressionslevel der Gene. Rot = hoch, blau = niedrig.

Subtyp hohe RNA-Spiegel von BCL-2 (*BCL2*), BCL-XL (*BCL2L1*) oder BCL-w (*BCL2L2*) exprimierte. Die Menge dieser Proteine im Western Blot schien somit keinen Rückschluss auf mRNAs Expression in der Sequenzierung zuzulassen, eine Behandlung mit ABT-263 wirkte sich jedoch auch auf die exprimierten RNA-Spiegel aus.

Der bei allen Versuchen besonders sensible Subtyp KMT2Ar #1 reagierte auf die ABT-263 Therapie unter anderem mit einer Hochregulation von *BCL2L1* (BCL-XL), *MCL1*, *BCL2L11* (BIM), sowie der Herabregulation von *TP53*, *PMAIP1* (NOXA), *BID*, *BIK*, *BMF* und *APAF1*. (Abbildung 12).

Bei KMT2Ar #4 fiel die besonders starke Hochregulation von *BCL2A1* auf (Abbildung 12). *BCL11B* wurde ebenfalls hochreguliert. Die Bedeutung von *BCL11B* für die Apoptose ist jedoch noch weitestgehend unbekannt, bisher ist vor allem die Funktion der IL-2 Regulation in CD4⁺ T-Lymphozyten bekannt (Cismasiu, Ghanta et al. 2006). KMT2Ar #4 reagierte außerdem durch Hochregulation von *BCL2L14*, auch als BCLG bekannt. Zusätzlich wurden auch *BCL2*, *APAF1*,

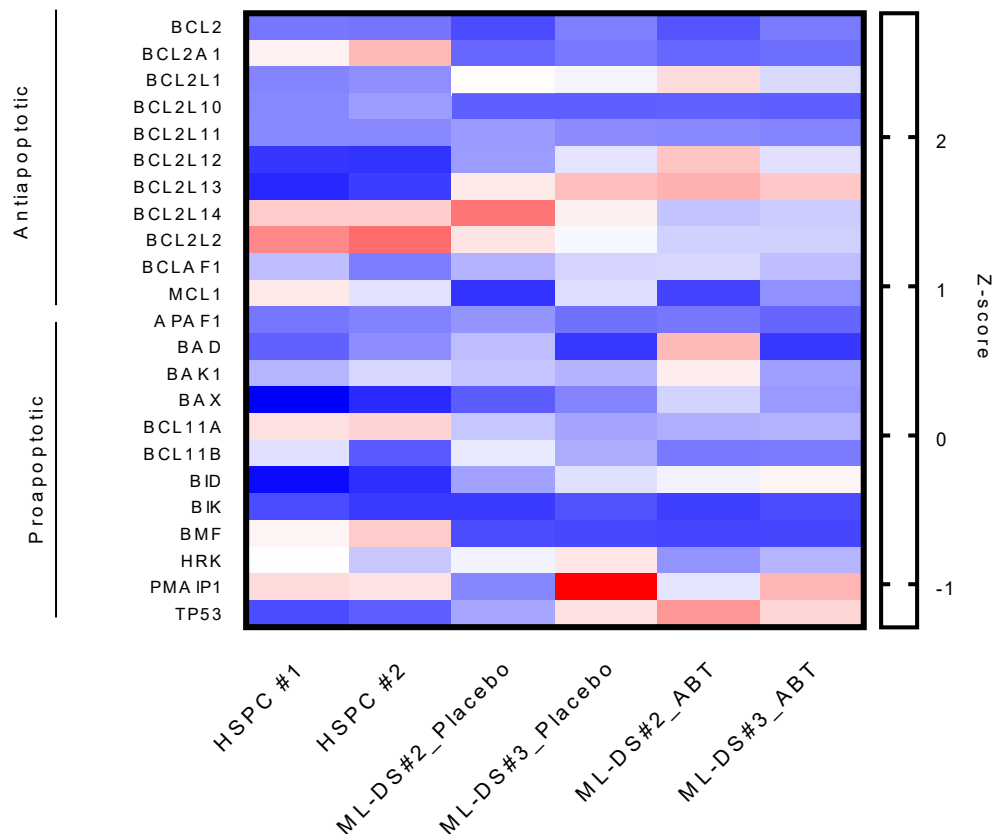


Abbildung 13: mRNA Sequenzierung von ML-DS #2 und #3 zeigt die Resistenzentwicklung dieses Subtyps:

mRNA Sequenzierung von Knochenmarkszellen der Endpunkt-Mäuse von ML-DS #2 und #3. Die Werte wurden zur besseren Anschaulichkeit von Veränderungen logarithmisch formatiert. Eine Farbskala veranschaulicht das quantitative Expressionslevel der Gene. Rot = hoch, blau = niedrig.

die Gene der BH3 bindenden Proteine, sowie *TP53* als Zeichen der Resistenzbildung herabreguliert.

Die *in vitro* und *in vivo* resistenten Subtypen ML-DS #2 und #3 zeigten ähnliche Reaktionen auf die ABT-263 Behandlung (Abbildung 13). So wurde bei ML-DS #2 *BCL2L1*, aber auch *BCL2L12* hochreguliert. Auch bei ML-DS #2 und #3 zeigte sich der *TP53* – *PMAIP1* Stoffwechselweg betroffen, jedoch waren diese beiden Gene unerwartet hochreguliert, was auf eine erhöhte Apoptose Bereitschaft schließen lässt. Auch die Gene der pro-apoptotischen BH3 Proteine BAD und BID waren hochreguliert. Als Zeichen der Resistenzbildung war bei ML-DS #3 *PMAIP1* zusätzlich herunter reguliert.

8 5. Diskussion

Wir berichten über die umfangreiche präklinische Testung von ABT-263 (Navitoclax) bei verschiedenen pädiatrischen Subtypen der AML. Wir konnten zeigen, dass ABT-263 das Fortschreiten der pädiatrischen AML bei Vorliegen einer *KMT2A*-Mutation *in vitro* und *in vivo* erfolgreich begrenzen kann. Bei dieser Untergruppe kann sich durch die Behandlung auch die Überlebenszeit von xenotransplantierten Mäusen verlängern. ML-DS Patientenzellen erwiesen sich in allen durchgeführten Experimenten als weitgehend refraktär gegenüber der pro-apoptotischen ABT-263-Therapie und konnten insbesondere nicht von einem Überlebensvorteil profitieren. Dies war deshalb unerwartet, da ML-DS bei einer konventionellen Chemotherapie üblicherweise eine erhöhte Sensibilität aufweist (Uffmann, Rasche et al. 2017). Wir konnten erstmals zeigen, dass diese Sensibilität nicht für eine pro-apoptotische Therapie mit ABT-263 zu gelten scheint.

Wir nutzten das Dosis-Wirkungs-Assay erfolgreich als Screening Methode zur Evaluation der Sensibilität der AML-Subtypen gegenüber ABT-263. Die Ergebnisse dieser Untersuchung korrelierten weitgehend mit den nachfolgenden Untersuchungen, insbesondere den *in vivo* Ergebnissen. Dadurch konnten wir zeigen, dass dieses Verfahren eine unkomplizierte, schnelle und kostengünstige Methode zur Abschätzung der Sensibilität einer Probe gegenüber einer Therapie mit ABT-263 darstellt. Zur Testung der Induktion der Apoptose durch ABT-263 nutzten wir das Annexin V Assay. Hier korrelierten die Ergebnisse der Zelllinien gut mit denen des Dosis-Wirkungs-Assays. Bei nahezu allen AML Blasten konnte ABT-263 die Apoptose zu induzieren. Dies korrelierte allerdings nicht bei allen Subtypen mit einer Sensibilität im Dosis-Wirkungs-Assay. Insbesondere bei ML-DS Patientenzellen zeigte sich eine große Diskrepanz, da sie beim Screening größtenteils refraktär gegenüber ABT-263 waren, jedoch im Annexin V Assay die Apoptose induziert werden konnte. Der pro-apoptotische Effekt von ABT-263 auf ML-DS, bei niedrigen Konzentrationen von 0,5 μM , war bei jedoch geringer im Vergleich zu *KMT2A* Patientenzellen. ABT-263 konnte also den Anteil der sich in Apoptose befindenden Zellen bei ML-DS erhöhen, dies hatte aber keinen Einfluss auf die gesamte Zellpopulation. Eine stärkere Apoptose Induktion bei ML-DS Patientenzellen ließ sich nur in höheren Konzentrationen erreichen, die Therapeutische Breite war also geringer. Daraus lässt sich auf einen noch unbekannten Kompensationsmechanismus schließen, welcher die Zellzahl bei ML-DS stabilisierte.

Die durch shRNA-Knockdown unterdrückte BCL-2- oder BCL-XL-Expression wirkte sich bei sonst hoher Expression des jeweiligen Proteins binnen weniger Tage negativ auf das Wachstum der Zellpopulation aus. So zeigten wir die vitale Abhängigkeit von BCL-2, bzw. BCL-XL bei kindlicher AML auf. Dies unterstreicht die Bedeutung der BCL-2 Proteinfamilie für das Überleben von pädiatrischen AML Blasten. Insbesondere bei hoher Expression von BCL-XL scheint meist auch eine vitale Abhängigkeit, vor allem für ML-DS und AMKL, gegeben.

Hingegen scheint die Höhe der BCL-2 Expression nicht maßgeblich mit der BCL-2 Abhängigkeit zu korrelieren. Vielmehr reichte bei den getesteten AML Blasten bereits ein geringer BCL-2 Spiegel aus, um die Zellpopulation durch dessen Inhibition deutlich zu dezimieren.

Es ist bereits bekannt, dass hohe BCL-2-Spiegel günstig für die Therapie mit BCL-2- und BCL-XL-Hemmern sind (Certo, Del Gaizo Moore et al. 2006, Merino, Khaw et al. 2012, Potter and Letai 2016, Punnoose, Levenson et al. 2016). Der Zusammenhang mit der pädiatrischen AML ist jedoch noch nicht belegt und auch die Refraktarität von ML-DS Zellen ist eine neue Erkenntnis. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Subtypen mit deutlicher BCL-2-Expression in der Regel eine höhere Sensibilität gegenüber ABT-263 in Dosis-Wirkungs-Experimenten zeigten, insbesondere wenn sie im BH3-Profilung keine BCL-XL oder MCL-1 Abhängigkeit aufwiesen. Diese Ergebnisse konnten sowohl in Zelllinien als auch in Patientenzellen nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht zielführend den erwarteten Wirkungsgrad von ABT-263 auf das Expressionsprofil der Proteine der BCL-2 Familie zu reduzieren, da die alleinige Expression von BCL-2 nicht zwangsläufig mit der Sensibilität gegenüber ABT-263 korreliert. Tierversuche bestätigten die zuvor *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse und legten nahe, dass ML-DS gegenüber einer Behandlung mit ABT-263 refraktär ist, obwohl BCL-XL ein dominanter Akteur für das Überleben dieser Zellen zu sein scheint. So spielt BCL-XL bei der Elimination von Leukämiezellen anscheinend eine untergeordnete Rolle gegenüber BCL-2, trotz des übergreifenden Wirkungsspektrums von ABT-263. Wir zeigten also, dass eine Resistenz gegen die Therapie mit BH3-Mimetika bei kindlicher AML bereits *in vitro* bestimmt werden kann und die vitale Abhängigkeit der Zellen unter den Mitgliedern der BCL-2 Familie ungleich verteilt ist. Hierzu erwiesen sich das Dosis-Wirkungs-Assay und das BH3-Profilung als valide Screening Methoden bezüglich der Vorhersagbarkeit eines Therapieerfolgs. So kann bei einer Sensibilität im Dosis-Wirkungs-Assay im Anschluss ein BH3 Profilung Assay durchgeführt werden, um nachzuweisen, welche BH3 Proteine eine dominante- und welche eine untergeordnete Rolle spielen. Hier könnte beispielsweise bei gleichzeitigem Vorliegen einer BCL-2 und MCL-1 Abhängigkeit eine Kombinationstherapie mit einem MCL-1 Inhibitor angestrebt werden, welche in Folge erneut im Dosis-Wirkungs-Assay überprüft werden kann (Ma, Zhao et al. 2019, Janssen, Schmidt et al. 2022, Liu, Zhao et al. 2022). Die Resultate würden ausreichen, um das Therapiemodell *in vivo* zu überprüfen. Diese Methode ist vor allem ansprechend, da binnen kürzester Zeit eine Aussage zur Wirksamkeit getroffen werden kann. Dies wäre insbesondere von Bedeutung, da bei der klinischen Therapieplanung der AML die Zeit ein entscheidender Faktor ist. Häufig ist hier die genetische Testung, welche Rückschlüsse auf den langfristigen Therapieerfolg zulässt, erst nach Therapiebeginn abgeschlossen. Die von uns getesteten Methoden könnten, nach umfangreicher präklinischer Testung, im Rahmen einer klinischen Studie an einem spezialisierten Zentrum bereits in der Initialdiagnostik Anwendung finden. So könnten bei einer initialen Blutentnahme entnommene Leukämiezellen zuerst mittels

Durchflusszytometrie sortiert und im Anschluss direkt auf Ihre Sensibilität gegenüber BH3-Mimetika getestet werden. Hierzu ließe sich ein entsprechendes Panel vorbereiten und bei Bedarf standardisiert einsetzen (Olesinski and Bhatt 2021).

Die Bedeutung der Western Blot Ergebnisse bezüglich der BCL-Proteinspiegel als Prädiktoren für eine erfolgreiche Therapie rücken durch unsere Ergebnisse deutlich in den Hintergrund. Weitere Faktoren, welche maßgeblich für den Therapieerfolg mit BH3-Mimetika wie ABT-263 sind, werden durch eine Reduzierung auf Proteinspiegel unzureichend dargestellt. Insbesondere die eindimensionale Darstellung der pro- und anti-apoptotischen Proteine ist hier nicht ausreichend. Daher ist eine multimodale Testung auch bei günstigem Expressionsprofil unvermeidlich, bevor eine Testung *in vivo* oder gar im Rahmen einer klinischen Studie vorgenommen werden kann. Unsere Ergebnisse zeigen auch, dass eine fehlende Resistenz gegen die ABT-263-Behandlung bei KMT2Ar einem günstigen Expressionsprofil von BCL-2 und -XL in Bezug auf die *in-vivo*-Wirksamkeit überwiegt. Die von uns getesteten KMT2Ar-Patientenzellen zeigten nur moderate Mengen an BCL-2 und BCL-XL, waren jedoch sensibel gegen ABT-263. Dieser Effekt könnte sich daher erklären lassen, dass die Höhe der BCL-2 nicht maßgeblich ist und ausreicht, um durch die Inhibition eine pro-apoptotische Kettenreaktion in Gang zu setzen. Dies war vermutlich dadurch möglich, weil bei KMT2Ar Blasten keine kompensatorischen Mechanismen – wie eine MCL-1 Erhöhung – aktiv waren.

Die bereits *in vitro* angedeuteten Unterschiede zwischen den leukämischen Untergruppen wurden in den *in vivo* Untersuchungen nochmal verdeutlicht. ABT-263 zeigte hier vor allem ein großes Potenzial zur Reduzierung der Leukämielast der Versuchstiere, was durch Blut- und Organuntersuchungen nachgewiesen werden konnte. Diese Eigenschaft wäre klinisch in der Induktionstherapie von Nutzen, bei der es das Ziel ist, die Leukämielast möglichst verträglich drastisch zu reduzieren so lange noch keine kompensatorischen Mutationen gegen die Therapie gebildet werden konnten. ABT-263 könnte hier in Kombination mit etablierten Chemotherapeutika wie Azacitidin oder Decitabin dazu beitragen, eine Remission zu erreichen (Das 2018, DiNardo, Pratz et al. 2019, Zhu, Crombie et al. 2023). Therapielimitierend wäre hier wahrscheinlich die durch ABT-263 induzierte Thrombozytopenie, welche durch die Kombination mit anderen myelosuppressiven Medikamenten noch verstärkt würde (Tse, Shoemaker et al. 2008). Allerdings könnte eine Kombination mit ABT-263 potenziell die therapeutische Dosis der gängigen Chemotherapeutika reduzieren und so die kumulative Toxizität der Induktionstherapie verringern.

Ein signifikant verlängertes Überleben wurde bei KMT2Ar #1, #2 und #4 gefunden, während bei allen ML-DS Subtypen, sowie bei KMT2Ar #3 die Überlebenszeit von Behandlungs- und Kontrollgruppen nicht signifikant verlängert war. Dies zeigt, dass ein Überlebensvorteil durch eine ABT-263 Therapie bei günstigem Expressions- und Resistenzprofil möglich ist. Außerdem zeigte sich bei dem überwiegenden Teil der Versuchsgruppen eine signifikante Reduktion der

Leukämie last im Knochenmark. KMT2Ar #1, #2 und #4 zeigten bei den *in vitro* Versuchen ein gutes Ansprechen auf eine Therapie mit ABT-263, sowie eine BCL-2 Abhängigkeit. Die Voruntersuchungen deuteten also bereits auf ein gutes Ansprechen hin, was *in vivo* bestätigt werden konnte. Umgekehrt stimmten auch die Vorversuche mit ML-DS mit den *in vivo* Ergebnissen überein. Wir schließen daraus, dass eine Abschätzung des Therapieansprechens möglich ist. Eine ABT-263 Monotherapie zeigt Potenzial in der Verlängerung des Überlebens und der Reduktion der Leukämie last bei pädiatrischer AML mit *KMT2A* Aberration. Dieser Effekt könnte in Kombination mit etablierten Chemotherapeutika verstärkt werden. Da jedoch noch nicht alle einflussnehmenden Faktoren bekannt sind, bedarf es auch der weiteren Suche nach Resistenzmechanismen. Dies könnte sich vorteilhaft auf die Patientenselektion, Planung und Wahl der Kombinationspartner auswirken. Es empfiehlt sich, die Screening Tests zur Sensibilitätsprüfung zu standardisieren und in größeren Kohorten auf ihre Verlässlichkeit zu überprüfen. Es gibt hierzu bereits Modelle, welche sich jedoch vor allem auf das Expressionsprofil fokussieren (Suryani, Carol et al. 2014). Das BH3 Profiling spielt hier bereits eine größere Rolle (Potter, Du et al. 2021). Die Kombination mit Dosis-Wirkungs- Assays könnte die Sensitivität des Screenings nochmals erhöhen.

KMT2Ar-Leukämien tragen häufig eine Chemotherapie Resistenz und zeichnen sich daher durch eine schlechte Prognose aus (Muntean and Hess 2012, Khaw, Suryani et al. 2016). Die hohe Wirksamkeit von ABT-263 gegenüber KMT2Ar *in vitro* und *in vivo* deutet auf ein suffizientes apoptotisches *Priming* dieser Untergruppe und damit auf die Überwindung der gängigen Chemotherapie Resistenz durch Stimulation der Apoptose hin. Die pro-apoptotische Therapie mit BH3-Mimetika ist daher ein vielversprechender Weg in der Therapie der pädiatrischen KMT2Ar AML.

Nachfolgende vergleichende mRNA-Sequenzierungen zwischen Placebo und Behandlungsgruppe der *in vivo* Versuche, deuteten auf Kompensationsmechanismen von KMT2Ar und ML-DS durch Hochregulation von MCL-1 und Herabregulation von *PMAIP1* hin, welches für NOXA kodiert. NOXA, BID, BIM, BIK und BMF sind wichtige, an die BH3-Domäne bindende *Sensitizer* Proteine und somit stark pro-apoptotisch. Noxa bindet spezifisch an MCL-1.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Balance der Gegenspieler NOXA und MCL-1 einen therapielimitierenden Einfluss bei der Behandlung von Neoplasien haben kann (Mei, Xie et al. 2007). So wirkt sich eine niedrige Expression von MCL1 und ein NOXA vermitteltes Priming von Leukämiezellen günstig auf eine ABT-263 Therapie aus (Suryani, Carol et al. 2014). So konnte ebenfalls bereits gezeigt werden, dass eine medikamentöse Erhöhung des NOXA-Spiegels durch Vorinostat mit einer günstigen Prognose durch eine Behandlung mit ABT-737 korreliert (Nakajima, Sharma et al. 2016). Dieser Effekt ließe sich wahrscheinlich ebenfalls für die Behandlung mit ABT-263 nutzen. Für eine herausragende Rolle von NOXA und MCL-1 in der

Resistenzbildung gegen ABT-263 spricht ebenfalls die Herabregulation von *TP53*. Das *TP53* Gen kodiert für das Protein P53, welches einen wichtigen Induktor der Apoptose darstellt (Abbildung 1) und bei der Tumorentstehung und Resistenzbildung eine wichtige Rolle spielen kann (Aubrey, Kelly et al. 2018). In Hinblick auf die intrinsische Aktivierung der Apoptose spielt P53 eine Schlüsselrolle, welche unter anderem durch NOXA im finalen Schritt vollendet wird (Oda, Ohki et al. 2000, Zhang, Li et al. 2013). NOXA bindet hier an MCL-1, welches gebundenes BAK freigibt und so die Apoptose fördert. Im Regelfall wird dieser Mechanismus durch zellulären Stress verursacht. Da in unseren Versuchen bei KMT2Ar #1 und #4 *TP53* und *PMAIP1* (NOXA) herunterreguliert wurden, lässt sich hieraus ein resistenzfördernder Zusammenhang mit diesem Stoffwechselweg mutmaßen. Der Mechanismus entspräche somit einer indirekten Verstärkung der anti-apoptotischen Wirkung von MCL-1. Durch Verringerung von NOXA könnte MCL-1 mehr BAX und BAK binden, welches die Einleitung der Apoptose erschweren würde.

Wir konnten bei KMT2Ar #4 eine therapieinduzierte Hochregulation von *BCL2A1* feststellen (Abbildung 12). *BCL2A1* ist ein Ziel des Transkriptionsfaktors NF- κ B und von herausragender Bedeutung in der Vermittlung von Inflammation und Apoptose. Es kann die Menge an aus dem Mitochondrien freigesetztem Cytochrom c reduzieren und so die Caspase Kaskade indirekt inhibieren (Akatsuka, Nishida et al. 2003, Vogler 2012). *BCL2A1* ist bisher vor allem bei erwachsenen Patienten als Faktor bei fortgeschrittenen oder metastasierten Krankheitsstadien bekannt (Vogler 2012). Hier zeigten wir erstmals eine Assoziation mit kindlicher AML. Dieses anti-apoptotische Protein ist bisher insgesamt noch unzureichend untersucht und die pathophysiologischen Implikationen einer Überexpression sind noch unzureichend verstanden. Insbesondere gibt es noch keine etablierten pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten. Es wurde von einer Venetoclax-Resistenz durch Hochregulation von *BCL2A1* berichtet, welche durch eine synergistische Behandlung mit dem MCL1-Inhibitor AZD5991 überwunden werden konnte (Zhang, Nakauchi et al. 2020). *BCL2A1* wurde hier als Risikofaktor für eine BCL-2 Inhibitor Resistenz beschrieben. Bei adulter AML mit einem normalen Karyotyp könnte eine *BCL2A1* Erhöhung gehäuft auftreten (Nagy, Lundán et al. 2003). Bei AML mit Mutationen in den Genen für *FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3-ITD)* und der *FMS like tyrosine-kinase (FLT3-TKD)* ist *BCL2A1* wahrscheinlich bei der Resistenzbildung gegen die Therapie mit Tyrosinkinase Inhibitoren wie Ruxolitinib involviert (Yamatani, Ai et al. 2020). Hier wurde aber auch das Potenzial zur indirekten Inhibition von *BCL2A1* deutlich: Die BRD4 Blockade mit einem *Bromodomain and Extra-Terminal motif* (BET) Inhibitor (CPI-0610) führt zur Reduzierung von *BCL2A1*, da die Promotor Region von *BCL2A1* eine BRD4 Domäne aufweist. Außerdem führt eine STAT5 Inaktivierung mit dem Typ 1 Tyrosinkinase Inhibitor Gilteritinib zu einer verringerten Expression von *BCL2A1* und zeigt sogar synergistische Effekte bei der Kombination mit Venetoclax (Yamatani, Ai et al. 2022). Eine pharmakologische Beeinflussung des *BCL2A1* Spiegels ist also möglich, der Effekt auf die kindliche AML jedoch noch unbekannt. Da vor allem

KMT2Ar #4 besonders sensibel auf ABT-263 reagierte, gehen wir davon aus, dass *BCL2A1* bei diesem Subtyp eine maßgebliche Rolle in der Resistenzbildung spielt. Da *BCL2A1* als Faktor bei der Resistenzbildung kindlicher AML noch weitestgehend unbekannt ist, würde es sich lohnen, die Rolle dieses anti-apoptotischen Spielers in der Apoptose näher zu beleuchten. So besteht die Möglichkeit einen neuen, noch unbekannten Therapieansatz für refraktäre kindliche AML näher zu beleuchten und möglicherweise das Outcome positiv zu beeinflussen. Hier könnte man beispielsweise zunächst mittels shRNA Inhibition *in vitro* arbeiten. Die apoptotischen Interaktionspartner von *BCL2A1* sind mit vor allem BID, BIM und PUMA, sowie – wenn auch schwächer – BIK, HRK und NOXA sehr breit aufgestellt (Chen, Willis et al. 2005). Dies könnte beim BH3 Profiling eine eindeutige Aussage zur einer *BCL2A1* Abhängigkeit erschweren. Hier bietet sich vor allem die mRNA-Sequenzierung oder der Western Blot mit speziellen Antikörpern für eine genauere Aussage an. Außerdem sollten Möglichkeiten der pharmakologischen Beeinflussung der Expression und der Aktivität von *BCL2A1* näher beleuchtet werden. Hierzu könnte man einen möglichen, wenn auch indirekten, Effekt der etablierten BH3 Mimetika auf *BCL2A1* untersuchen. Da sich die BH3 Bindungsstellen der BCL-Familie sehr ähneln, könnte sich ein gewisser Effekt mutmaßen lassen. Auf der anderen Seite macht es Sinn, die Interaktionspartner von *BCL2A1* genau zu identifizieren, da durch Beeinflussung des Signalwegs auch die Aktivität von *BCL2A1* gemindert werden könnte. Schlussendlich ist es zunächst wichtig, die Relevanz von *BCL2A1* zu definieren. Hierzu bietet sich die mRNA-Sequenzierung oder ein PCR-Screening von einer entsprechenden Anzahl an Proben von Patienten mit kindlicher AML an (Umeda, Ma et al. 2024). Wir konnten bei KMT2Ar #4 eine Herabregulation von *BCL2L14* nachweisen. *BCL2L14* ist mit einer erhöhten Bereitschaft zur Apoptose assoziiert (Luo, Wu et al. 2009) und ist somit am ehesten als pro-apoptotische Reaktion auf die ABT-263 Behandlung zu verstehen.

Die Hochregulation von *BCL2L12* bei ML-DS #2 zeigt einen weiteren Weg der Resistenzbildung auf. *BCL2L12*, inhibiert die Expression der wichtigen Caspasen 3 und 7 und ist bei Überexpression mit einem schlechten Outcome in der AML assoziiert (Nishioka, Ikezoe et al. 2015). Wir schlossen aus der Involvierung des P53 Stoffwechselwegs zwar auf eine erhöhte Apoptose-Bereitschaft bei den beiden ML-DS Proben (vgl. Abbildung 4). Eine Hochregulation von *BCL2L12* und die Herabregulation von *PMAIP1* könnte jedoch einen starken antagonistischen Effekt hierzu bewirkt haben. In der Folge zeigten sich ML-DS Proben resistent. Unsere Analysen lassen somit vermuten, dass die Gene *BCL2L1*, *MCL1*, *BCL2A1*, *BCL2L12*, *PMAIP1* und *TP53* mögliche Ausgangspunkte für die Resistenzentwicklung der AML-Gruppen darstellen. Insbesondere der intrinsische p53 vermittelte Aktivierungsweg der Apoptose könnte hier einen neuen Ansatz darstellen.

Teilweise wurde auch eine Herunterregulierung der mRNA-Spiegel von *BCL-2* und eine Hochregulierung von *BCL2L1* (BCL-XL) beobachtet. Dies zeigte sich bei KMT2Ar #1 besonders

stark und in geringerem Maße auch bei ML-DS #2. Die Hochregulation von BCL-XL und MCL-1 sind bekannte Mechanismen der Resistenz gegenüber pro-apoptotischen Therapien (Choudhary, Al-Harbi et al. 2015, Luedtke, Niu et al. 2017). Wir gehen davon aus, dass sich besonders bei KMT2Ar #1 das Wirkungsspektrum von ABT-263 bezüglich der BCL-XL Inhibition günstig auf das Outcome dieses Subtyps auswirkte. Auch ließe sich mutmaßen, dass sich die Hochregulation von *HRK*, welches für das BCL-XL spezifische *Sensitizer* Protein HRK kodiert, förderlich auf den Therapieeffekt bei KMT2Ar #4 ausgewirkt haben könnte. Ein Erklärungsansatz für den wirkungsvollen Effekt von ABT-263 auf KMT2Ar #1 und #4 könnte sein, dass ABT-263 eine Überexpression von BCL-XL in seinem Wirkspektrum mit abdeckt. Eine alleinige Hochregulation von *BCL2L1* würde so keine suffiziente Resistenzbildung ermöglichen.

Da eine direkte Hemmung aller anti-apoptotischen Regulator-Proteine sehr toxisch wäre, stellt eine Kombinationstherapie mit Cytarabin, Daunorubicin oder dem CHK1-selektiven Inhibitor LY2603618 eine Alternative dar. Die Wirksamkeit der Behandlung ließe sich so möglicherweise verbessern, da DNA-Strangbrüche unter anderem zur Herunterregulation von MCL-1 führen können (Niu, Zhao et al. 2016, Zhao, Niu et al. 2016, Bhatt, Pioso et al. 2020). Die Effektivität einer Kombination von einem BH3 Mimetikum und einem MCL-1 Inhibitor zeigte sich bereits bei der Kombination von Venetoclax (ABT-199) mit dem MCL-1 selektiven Inhibitor S63845 (Bhatt, Pioso et al. 2020, Hormi, Birsén et al. 2020).

Unsere Ergebnisse spiegeln die Möglichkeiten einer umfangreichen ABT-263-Testung wider und zeigen die Vorteile und Grenzen des Arzneimittels auf. Eine wesentliche Limitation unserer Studie ist, dass wir keine eindeutige Ursache für die beobachteten Resistenzen gegen ABT-263 finden konnten. Eine gezielte und umfassende Analyse wäre von Nöten, um die Therapie mit ABT-263 zu optimieren und potenzielle Kombinationspartner auszuwählen (Bhatt, Pioso et al. 2020). Durch unsere Untersuchungen werden jedoch verschiedene Ansatzstellen für bekannte und unbekannte Resistenzmechanismen deutlich. Wir heben die Bedeutung der Aktivität von MCL-1 und BCL-XL zur Resistenzbildung, insbesondere in Zusammenhang mit der BCL-2 Aktivität, hervor. Ebenfalls wurde die Bedeutung des NOXA-MCL-1 Interaktionswegs näher beleuchtet und in diesem Zusammenhang unterstrichen. Eine Berücksichtigung des durch P53 induzierten Signalwegs der Apoptose Induktion in Zusammenhang mit einer pro-apoptotischen Therapie ist sinnvoll, um potenzielle Resistenzwege zu antizipieren und Gegenmaßnahmen zu entwickeln. Außerdem gilt es die Bedeutung von *BCL2A1* für die pädiatrische AML zu evaluieren.

9 Zusammenfassung

Zusammenfassend legen unsere Ergebnisse nahe, dass die Apoptose und insbesondere die Überexpression von BCL-2-Familienmitgliedern eine Schlüsselrolle in der Überlebensstrategie der pädiatrischen AML, insbesondere bei *KMT2A*-Aberration, spielen können. Zwar war die Bedeutung von BCL-2 für andere Formen der adulten und kindlichen Leukämie bereits beschrieben, wir wiesen diesen Zusammenhang hier jedoch erstmals bei der kindlichen AML nach. Eine deutliche BCL-2-Expression und eine geringe Aktivität von MCL-1 scheint für die Therapie mit ABT-263 besonders günstig zu sein. Außerdem ist es möglich, die *in-vivo*-Wirksamkeit von ABT-263 durch *in-vitro*-Tests weitestgehend vorherzusagen. Hierzu verwendeten wir erfolgreich eine Kombination aus Dosis-Wirkungs-Assays und BH3-Profilings. Um die Sensitivität und Spezifität der Tests im Hinblick auf den *in-vivo*-Behandlungserfolg zu erhöhen, besteht die Möglichkeit das Screening um eine mRNA-Sequenzierung der BCL-2 Familienmitglieder und einen NOXA Western Blot zu erweitern. Valide Screening Methoden bieten die Möglichkeit zukünftige *in vivo* Untersuchungen besser planen zu können. Eine Optimierung dieser würde sich insbesondere in Hinblick auf eine klinische Testung lohnen.

Außerdem wiesen wir in unseren Untersuchungen erstmals eine Refraktarität von kindlicher ML-DS gegenüber einer pro-apoptotischen Therapie nach. Dies ist ein wichtiges Erkenntnis für diese besonders vulnerable Patientengruppe. Wir vermuten hier einen bisher noch unbekannten Kompensationsmechanismus, der zur Therapieresistenz gegen ABT-263 führt. Wir zeigten, dass eine günstige Proteinexpression von BCL-2 und BCL-XL allein kein valider Prädiktor für eine erfolgreiche Therapie mit ABT-263 ist. Vielmehr bedarf es einer umfassenderen Testung im Sinne der bereits genannten Screening Verfahren. Es zeigte sich das Fehlen von Resistenzmechanismen im Sinne einer erhöhten MCL-1 Aktivität als bedeutender für den Therapieerfolg als eine hohe Expression von BCL-2. Dies wurde deutlich bei der Testung der *KMT2Ar*-Patientenzellen, welche ein gutes Therapieansprechen bei meist nur moderater BCL-2 Expression zeigten. Insgesamt zeigten die *KMT2Ar*-Subtypen eine erhöhte Sensibilität auf eine pro-apoptotische Therapie, bei sonst eher ungünstigem Therapieansprechen auf eine konventionelle Chemotherapie. Insbesondere *in vivo* wurde das Potenzial zur Reduktion der Leukämielast und Verlängerung des Überlebens durch ABT-263 bei *KMT2Ar* deutlich. Es war jedoch auch möglich die Leukämielast bei ML-DS teilweise signifikant zu reduzieren.

Neben der Herausarbeitung eines Screening Protokolls für die Testung der Wirksamkeit von ABT-263 und der Untersuchung der Wirkung auf ML-DS und *KMT2Ar*, zeigten wir auch mögliche Faktoren, welche sich potenziell therapielimitierend ausgewirkt haben können. Hier wurde die herausragende Rolle der NOXA-MCL-1 Interaktion deutlich, möglicherweise in Zusammenhang mit dem P53 Signalweg. Erstmals wiesen wir eine Assoziation von *BCL2A1* bei der Resistenzbildung der kindlichen AML nach. Dieser bei kindlicher Leukämie noch unzureichend untersuchte Signalweg könnte von entscheidender Bedeutung sein. Außerdem

legen unsere Ergebnisse nahe, dass eine kompensatorische Hochregulation von BCL-XL durch das Wirkspektrum von ABT-263 abgedeckt werden kann und so Resistenzen abgewendet werden können. Die entscheidenden Faktoren für den Therapieerfolg scheinen jedoch die Inhibition von BCL-2 und eine geringe MCL-1 Expression darzustellen.

Es ist notwendig, weitere Wirkstoffkombinationen von BH3-Mimetika zusammen mit bereits etablierten Chemotherapeutika zu untersuchen. So können Dosis und Nebenwirkungen möglicherweise vermindert und potenziell das Wirkspektrum der Chemotherapie erweitert werden.

Eine der größten Herausforderungen besteht darin, jene Patienten zu identifizieren, welche von einer Apoptose-modulierenden Therapie profitieren können. Das Feld der Apoptose Forschung ist äußerst aktiv und neue Tests und klinische Anwendungen werden regelmäßig vorgestellt. Es gilt nun, diese Evaluationsmöglichkeiten und Tests in ein klinisches Setting zu übertragen und anzuwenden, um zielgerichtete, individuelle Therapieregimes zu erschaffen.

Unsere Untersuchungen zeigen bisher unbekannte Wege von großer Bedeutung für die Therapie der pädiatrischen AML auf und unterstreichen die Möglichkeit einer Optimierung in der Behandlung dieser lebensbedrohlichen Erkrankung.

10 Literaturverzeichnis

Akatsuka, Y., T. Nishida, E. Kondo, M. Miyazaki, H. Taji, H. Iida, K. Tsujimura, M. Yazaki, T. Naoe, Y. Morishima, Y. Kodaera, K. Kuzushima and T. Takahashi (2003). "Identification of a polymorphic gene, BCL2A1, encoding two novel hematopoietic lineage-specific minor histocompatibility antigens." J Exp Med **197**(11): 1489-1500.

Alejo-Valle, O., K. Weigert, R. Bhayadia, M. Ng, H. Issa, C. Beyer, S. Emmrich, K. Schuschel, C. Ihling, A. Sinz, M. Zimmermann, C. Wickenhauser, M. Flasinski, E. Regenyi, M. Labuhn, D. Reinhardt, M. L. Yaspo, D. Heckl and J. H. Klusmann (2022). "The megakaryocytic transcription factor ARID3A suppresses leukemia pathogenesis." Blood **139**(5): 651-665.

An, Q., C. H. Fan and S. M. Xu (2017). "Recent perspectives of pediatric leukemia - an update." Eur Rev Med Pharmacol Sci **21**(4 Suppl): 31-36.

Athale, U. H., B. I. Razzouk, S. C. Raimondi, X. Tong, F. G. Behm, D. R. Head, D. K. Srivastava, J. E. Rubnitz, L. Bowman, C. H. Pui and R. C. Ribeiro (2001). "Biology and outcome of childhood acute megakaryoblastic leukemia: a single institution's experience." Blood **97**(12): 3727-3732.

Aubrey, B. J., G. L. Kelly, A. Janic, M. J. Herold and A. Strasser (2018). "How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?" Cell Death Differ **25**(1): 104-113.

Baev, D. V., J. Krawczyk, O. D. M and E. Szegezdi (2014). "The BH3-mimetic ABT-737 effectively kills acute myeloid leukemia initiating cells." Leuk Res Rep **3**(2): 79-82.

Benito, J. M., L. Godfrey, K. Kojima, L. Hogdal, M. Wunderlich, H. Geng, I. Marzo, K. G. Harutyunyan, L. Golfman, P. North, J. Kerry, E. Ballabio, T. N. Chonghaile, O. Gonzalo, Y. Qiu, I. Jeremias, L. Debose, E. O'Brien, H. Ma, P. Zhou, R. Jacamo, E. Park, K. R. Coombes, N. Zhang, D. A. Thomas, S. O'Brien, H. M. Kantarjian, J. D. Levenson, S. M. Kornblau, M. Andreeff, M. Müschen, P. A. Zweidler-McKay, J. C. Mulloy, A. Letai, T. A. Milne and M. Konopleva (2015). "MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemias Activate BCL-2 through H3K79 Methylation and Are Sensitive to the BCL-2-Specific Antagonist ABT-199." Cell Rep **13**(12): 2715-2727.

Betz, N. (2007). "Compatibility of the Pierce BCA Protein Assay with Promega Lysis Buffers and Lytic Assay Reagents." Retrieved 31.03., 2020, from <https://www.promega.de/resources/pubhub/enotes/compatibility-of-pierce-bca-protein-assay-with-promega-lysis-buffers-and-lytic-reagents/>.

Bhatt, S., M. S. Pioso, E. A. Olesinski, B. Yilma, J. A. Ryan, T. Mashaka, B. Leutz, S. Adamia, H. Zhu, Y. Kuang, A. Mogili, A. Louissaint, Jr., S. R. Bohl, A. S. Kim, A. K. Mehta, S. Sanghavi, Y. Wang, E. Morris, E. Halilovic, C. P. Paweletz, D. M. Weinstock, J. S. Garcia and A. Letai (2020). "Reduced Mitochondrial Apoptotic Priming Drives Resistance to BH3 Mimetics in Acute Myeloid Leukemia." Cancer Cell **38**(6): 872-890.e876.

- Brenner, H. and C. Spix (2003). "Combining cohort and period methods for retrospective time trend analyses of long-term cancer patient survival rates." British Journal of Cancer **89**(7): 1260-1265.
- Certo, M., V. Del Gaizo Moore, M. Nishino, G. Wei, S. Korsmeyer, S. A. Armstrong and A. Letai (2006). "Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members." Cancer Cell **9**(5): 351-365.
- Chen, L., S. N. Willis, A. Wei, B. J. Smith, J. I. Fletcher, M. G. Hinds, P. M. Colman, C. L. Day, J. M. Adams and D. C. Huang (2005). "Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function." Mol Cell **17**(3): 393-403.
- Chipuk, J. E., T. Moldoveanu, F. Llambi, M. J. Parsons and D. R. Green (2010). "The BCL-2 family reunion." Mol Cell **37**(3): 299-310.
- Choudhary, G. S., S. Al-Harbi, S. Mazumder, B. T. Hill, M. R. Smith, J. Bodo, E. D. Hsi and A. Almasan (2015). "MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies." Cell Death Dis **6**: e1593.
- Cismasiu, V. B., S. Ghanta, J. Duque, D. I. Albu, H. M. Chen, R. Kasturi and D. Avram (2006). "BCL11B participates in the activation of IL2 gene expression in CD4+ T lymphocytes." Blood **108**(8): 2695-2702.
- Creutzig, D., Reinhardt (01/1997, 03/2019). "L 11 Akute myeloische Leukämie – AML – im Kindes- und Jugendalter." 025-031 - Akute myeloische Leukämie (AML) im Kindes- und Jugendalter Retrieved 21.05.2022, 2022, from https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-031_S1_Akute-myeloische-Leukaemie-AML-Kinder-Jugendliche_2019-09.pdf.
- Creutzig, U., M. M. van den Heuvel-Eibrink, B. Gibson, M. N. Dworzak, S. Adachi, E. de Bont, J. Harbott, H. Hasle, D. Johnston, A. Kinoshita, T. Lehrnbecher, G. Leverger, E. Mejstrikova, S. Meshinchi, A. Pession, S. C. Raimondi, L. Sung, J. Sary, C. M. Zwaan, G. J. Kaspers and D. Reinhardt (2012). "Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel." Blood **120**(16): 3187-3205.
- Creutzig, U., M. Zimmermann, J. P. Bourquin, M. N. Dworzak, G. Fleischhack, N. Graf, T. Klingebiel, B. Kremens, T. Lehrnbecher, C. von Neuhoff, J. Ritter, A. Sander, A. Schrauder, A. von Stackelberg, J. Sary and D. Reinhardt (2013). "Randomized trial comparing liposomal daunorubicin with idarubicin as induction for pediatric acute myeloid leukemia: results from Study AML-BFM 2004." Blood **122**(1): 37-43.
- Creutzig, U., M. Zimmermann, M. N. Dworzak, J. Ritter, G. Schellong and D. Reinhardt (2013). "Development of a curative treatment within the AML-BFM studies." Klin Padiatr **225 Suppl 1**: S79-86.
- Crowther, D., C. J. Bateman, C. P. Vartan, J. M. Whitehouse, J. S. Malpas, G. H. Fairley and R. B. Scott (1970). "Combination chemotherapy using L-asparaginase, daunorubicin, and cytosine arabinoside in adults with acute myelogenous leukaemia." Br Med J **4**(5734): 513-517.

Czabotar, P. E., G. Lessene, A. Strasser and J. M. Adams (2014). "Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(1): 49-63.

Das, M. (2018). "Venetoclax with decitabine or azacitidine for AML." Lancet Oncol **19**(12): e672.

Debrincat, M. A., I. Pleines, M. Lebois, R. M. Lane, M. L. Holmes, J. Corbin, C. J. Vandenberg, W. S. Alexander, A. P. Ng, A. Strasser, P. Bouillet, M. Sola-Visner, B. T. Kile and E. C. Josefsson (2015). "BCL-2 is dispensable for thrombopoiesis and platelet survival." Cell Death Dis **6**: e1721.

Del Gaizo Moore, V., J. R. Brown, M. Certo, T. M. Love, C. D. Novina and A. Letai (2007). "Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737." J Clin Invest **117**(1): 112-121.

Del Gaizo Moore, V., K. D. Schlis, S. E. Sallan, S. A. Armstrong and A. Letai (2008). "BCL-2 dependence and ABT-737 sensitivity in acute lymphoblastic leukemia." Blood **111**(4): 2300-2309.

Deng, J., N. Carlson, K. Takeyama, P. Dal Cin, M. Shipp and A. Letai (2007). "BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents." Cancer Cell **12**(2): 171-185.

DiNardo, C. D., K. Pratz, V. Pullarkat, B. A. Jonas, M. Arellano, P. S. Becker, O. Frankfurt, M. Konopleva, A. H. Wei, H. M. Kantarjian, T. Xu, W. J. Hong, B. Chyla, J. Potluri, D. A. Pollyea and A. Letai (2019). "Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naïve, elderly patients with acute myeloid leukemia." Blood **133**(1): 7-17.

Driscoll, M. (1992). "Molecular genetics of cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*." J Neurobiol **23**(9): 1327-1351.

Ebb, D. H. and H. J. Weinstein (1997). "Diagnosis and treatment of childhood acute myelogenous leukemia." Pediatr Clin North Am **44**(4): 847-862.

Faber, A. C., A. F. Farago, C. Costa, A. Dastur, M. Gomez-Caraballo, R. Robbins, B. L. Wagner, W. M. Rideout, 3rd, C. T. Jakubik, J. Ham, E. J. Edelman, H. Ebi, A. T. Yeo, A. N. Hata, Y. Song, N. U. Patel, R. J. March, A. T. Tam, R. J. Milano, J. L. Boisvert, M. A. Hicks, S. Elmiligy, S. E. Malstrom, M. N. Rivera, H. Harada, B. E. Windle, S. Ramaswamy, C. H. Benes, T. Jacks and J. A. Engelman (2015). "Assessment of ABT-263 activity across a cancer cell line collection leads to a potent combination therapy for small-cell lung cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(11): E1288-1296.

Fan, T. J., L. H. Han, R. S. Cong and J. Liang (2005). "Caspase family proteases and apoptosis." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **37**(11): 719-727.

FDA. (2020). "FDA grants regular approval to venetoclax in combination for untreated acute myeloid leukemia." Retrieved 22.05.2022, 2022, from <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-regular-approval-venetoclax-combination-untreated-acute-myeloid-leukemia>.

Gamis, A. S. (2005). "Acute myeloid leukemia and Down syndrome evolution of modern therapy--state of the art review." Pediatr Blood Cancer **44**(1): 13-20.

Gandhi, L., D. R. Camidge, M. Ribeiro de Oliveira, P. Bonomi, D. Gandara, D. Khaira, C. L. Hann, E. M. McKeegan, E. Litvinovich, P. M. Hemken, C. Dive, S. H. Enschede, C. Nolan, Y. L. Chiu, T. Busman, H. Xiong, A. P. Krivoshik, R. Humerickhouse, G. I. Shapiro and C. M. Rudin (2011). "Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors." J Clin Oncol **29**(7): 909-916.

Gentile, M., A. Petrungaro, G. Uccello, E. Vigna, A. G. Recchia, N. Caruso, S. Bossio, L. De Stefano, A. Palumbo, F. Storino, M. Martino and F. Morabito (2017). "Venetoclax for the treatment of chronic lymphocytic leukemia." Expert Opin Investig Drugs **26**(11): 1307-1316.

Gruber, T. A. and J. R. Downing (2015). "The biology of pediatric acute megakaryoblastic leukemia." Blood **126**(8): 943-949.

Gutierrez-Martinez, P., L. Hogdal, M. Nagai, M. Kruta, R. Singh, K. Sarosiek, A. Nussenzweig, I. Beerman, A. Letai and D. J. Rossi (2018). "Diminished apoptotic priming and ATM signalling confer a survival advantage onto aged haematopoietic stem cells in response to DNA damage." Nat Cell Biol **20**(4): 413-421.

Hasle, H., I. H. Clemmensen and M. Mikkelsen (2000). "Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome." Lancet **355**(9199): 165-169.

Hormi, M., R. Birsén, M. Belhadj, T. Huynh, L. Cantero Aguilar, E. Grignano, L. Haddaoui, F. Guillonnet, P. Mayeux, M. Hunault, J. Tamburini, O. Kosmider, M. Fontenay, D. Bouscary and N. Chapuis (2020). "Pairing MCL-1 inhibition with venetoclax improves therapeutic efficiency of BH3-mimetics in AML." Eur J Haematol **105**(5): 588-596.

Janssen, M., C. Schmidt, P. M. Bruch, M. F. Blank, C. Rohde, A. Waclawiczek, D. Heid, S. Renders, S. Göllner, L. Vierbaum, B. Besenbeck, S. A. Herbst, M. Knoll, C. Kolb, A. Przybylla, K. Weidenauer, A. K. Ludwig, M. Fabre, M. Gu, R. F. Schlenk, F. Stölzel, M. Bornhäuser, C. Röllig, U. Platzbecker, C. Baldus, H. Serve, T. Sauer, S. Raffel, C. Pabst, G. Vassiliou, B. Vick, I. Jeremias, A. Trumpp, J. Krijgsvelde, C. Müller-Tidow and S. Dietrich (2022). "Venetoclax synergizes with gilteritinib in FLT3 wild-type high-risk acute myeloid leukemia by suppressing MCL-1." Blood **140**(24): 2594-2610.

Jin, Z. and W. S. El-Deiry (2005). "Overview of cell death signaling pathways." Cancer Biol Ther **4**(2): 139-163.

Kaatsch, S., Grabow, Becker. (2018, 04/2018). "German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2017 (1980-2016)." Retrieved 21.05.2022, 2022, from https://www.unimedizin-mainz.de/fileadmin/kliniken/dkk/pdf/jb/jb2017/jb2017_s.pdf.

Khaw, S. L., S. Suryani, K. Evans, J. Richmond, A. Robbins, R. T. Kurmasheva, C. A. Billups, S. W. Erickson, Y. Guo, P. J. Houghton, M. A. Smith, H. Carol, A. W. Roberts, D. C. Huang and R. B. Lock (2016). "Venetoclax responses of pediatric ALL xenografts reveal sensitivity of MLL-rearranged leukemia." Blood **128**(10): 1382-1395.

Kim, E. Y., J. Y. Jung, A. Kim, Y. S. Chang and S. K. Kim (2017). "ABT-737 Synergizes with Cisplatin Bypassing Aberration of Apoptotic Pathway in Non-small Cell Lung Cancer." Neoplasia **19**(4): 354-363.

Konopleva, M., R. Contractor, T. Tsao, I. Samudio, P. P. Ruvolo, S. Kitada, X. Deng, D. Zhai, Y. X. Shi, T. Sneed, M. Verhaegen, M. Soengas, V. R. Ruvolo, T. McQueen, W. D. Schober, J. C. Watt, T. Jiffar, X. Ling, F. C. Marini, D. Harris, M. Dietrich, Z. Estrov, J. McCubrey, W. S. May, J. C. Reed and M. Andreeff (2006). "Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia." Cancer Cell **10**(5): 375-388.

Konopleva, M. and A. Letai (2018). "BCL-2 inhibition in AML: an unexpected bonus?" Blood **132**(10): 1007-1012.

Kozuma, Y., H. Kojima, S. Yuki, H. Suzuki and T. Nagasawa (2007). "Continuous expression of Bcl-xL protein during megakaryopoiesis is post-translationally regulated by thrombopoietin-mediated Akt activation, which prevents the cleavage of Bcl-xL." J Thromb Haemost **5**(6): 1274-1282.

Krivtsov, A. V. and S. A. Armstrong (2007). "MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development." Nat Rev Cancer **7**(11): 823-833.

Labuhn, M., K. Perkins, S. Matzk, L. Varghese, C. Garnett, E. Papaemmanuil, M. Metzner, A. Kennedy, V. Amstislavskiy, T. Risch, R. Bhayadia, D. Samulowski, D. C. Hernandez, B. Stoilova, V. Iotchkova, U. Oppermann, C. Scheer, K. Yoshida, A. Schwarzer, J. W. Taub, J. D. Crispino, M. J. Weiss, Y. Hayashi, T. Taga, E. Ito, S. Ogawa, D. Reinhardt, M. L. Yaspo, P. J. Campbell, I. Roberts, S. N. Constantinescu, P. Vyas, D. Heckl and J. H. Klusmann (2019). "Mechanisms of Progression of Myeloid Preleukemia to Transformed Myeloid Leukemia in Children with Down Syndrome." Cancer Cell **36**(2): 123-138.e110.

Langebrake, C., U. Creutzig and D. Reinhardt (2005). "Immunophenotype of Down syndrome acute myeloid leukemia and transient myeloproliferative disease differs significantly from other diseases with morphologically identical or similar blasts." Klin Padiatr **217**(3): 126-134.

Letai, A. (2016). "BH3 Profiling." The Letai Lab - Targeting Cancer Cell Death Retrieved 12.02.2021, 2021, from <https://letailab.dana-farber.org/bh3-profiling.html>.

Letai, A., M. D. Sorcinelli, C. Beard and S. J. Korsmeyer (2004). "Antiapoptotic BCL-2 is required for maintenance of a model leukemia." Cancer Cell **6**(3): 241-249.

Liu, F., Q. Zhao, Y. Su, J. Lv, Y. Gai, S. Liu, H. Lin, Y. Wang and G. Wang (2022). "Cotargeting of Bcl-2 and Mcl-1 shows promising antileukemic activity against AML cells including those with acquired cytarabine resistance." Exp Hematol **105**: 39-49.

Lock, R., H. Carol, P. J. Houghton, C. L. Morton, E. A. Kolb, R. Gorlick, C. P. Reynolds, J. M. Maris, S. T. Keir, J. Wu and M. A. Smith (2008). "Initial testing (stage 1) of the BH3 mimetic ABT-263 by the pediatric preclinical testing program." Pediatr Blood Cancer **50**(6): 1181-1189.

Luedtke, D. A., X. Niu, Y. Pan, J. Zhao, S. Liu, H. Edwards, K. Chen, H. Lin, J. W. Taub and Y. Ge (2017). "Inhibition of Mcl-1 enhances cell death induced by the Bcl-2-selective inhibitor ABT-199 in acute myeloid leukemia cells." Signal Transduct Target Ther **2**: 17012.

Luo, N., Y. Wu, Y. Chen, Z. Yang, S. Guo, L. Fei, D. Zhou, C. Yang, S. Wu, B. Ni, F. Hao and Y. Wu (2009). "Upregulated BclG(L) expression enhances apoptosis of peripheral blood CD4+ T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus." Clin Immunol **132**(3): 349-361.

Ma, J., S. Zhao, X. Qiao, T. Knight, H. Edwards, L. Polin, J. Kushner, S. H. Dzinic, K. White, G. Wang, L. Zhao, H. Lin, Y. Wang, J. W. Taub and Y. Ge (2019). "Inhibition of Bcl-2 Synergistically Enhances the Antileukemic Activity of Midostaurin and Gilteritinib in Preclinical Models of FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia." Clin Cancer Res **25**(22): 6815-6826.

Maarouf, N., S. Mahmoud, R. Khedr, L. Lehmann, K. Shaaban, S. Ibrahim, S. Fahmy, O. Hassanain, N. Nader and A. Elhaddad (2019). "Outcome of Childhood Acute Megakaryoblastic Leukemia: Children's Cancer Hospital Egypt 57357 Experience." Clin Lymphoma Myeloma Leuk **19**(3): e142-e152.

Madhusoodhan, P. P., W. L. Carroll and T. Bhatla (2016). "Progress and Prospects in Pediatric Leukemia." Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care **46**(7): 229-241.

Masetti, R., F. Baccelli, D. Leardini, F. Gottardi, F. Vendemini, A. Di Gangi, M. Becilli, M. Lodi, M. Tumino, L. Vinci, M. Erlacher, B. Strahm, C. M. Niemeyer and F. Locatelli (2023). "Venetoclax-based therapies in pediatric advanced MDS and relapsed/refractory AML: a multicenter retrospective analysis." Blood Adv **7**(16): 4366-4370.

Mei, Y., C. Xie, W. Xie, X. Tian, M. Li and M. Wu (2007). "Noxa/Mcl-1 balance regulates susceptibility of cells to camptothecin-induced apoptosis." Neoplasia **9**(10): 871-881.

Merino, D., S. L. Khaw, S. P. Glaser, D. J. Anderson, L. D. Belmont, C. Wong, P. Yue, M. Robati, B. Phipson, W. D. Fairlie, E. F. Lee, K. J. Campbell, C. J. Vandenberg, S. Cory, A. W. Roberts, M. J. Ludlam, D. C. Huang and P. Bouillet (2012). "Bcl-2, Bcl-x(L), and Bcl-w are not equivalent targets of ABT-737 and navitoclax (ABT-263) in lymphoid and leukemic cells." Blood **119**(24): 5807-5816.

Meyer, C., E. Kowarz, J. Hofmann, A. Renneville, J. Zuna, J. Trka, R. Ben Abdelali, E. Macintyre, E. De Braekeleer, M. De Braekeleer, E. Delabesse, M. P. de Oliveira, H. Cavé, E. Clappier, J. J. van Dongen, B. V. Balgobind, M. M. van den Heuvel-Eibrink, H. B. Beverloo, R. Panzer-Grümayer, A. Teigler-Schlegel, J. Harbott, E. Kjeldsen, S. Schnittger, U. Koehl, B. Gruhn, O. Heidenreich, L. C. Chan, S. F. Yip, M. Krzywinski, C. Eckert, A. Möricke, M. Schrappe, C. N. Alonso, B. W. Schäfer, J. Krauter, D. A. Lee, U. Zur Stadt, G. Te Kronnie, R. Sutton, S. Izraeli, L. Trakhtenbrot, L. Lo Nigro, G. Tsaur, L. Fechina, T. Szczepanski, S. Strehl, D. Ilencikova, M. Molkentin, T. Burmeister, T. Dinger mann, T. Klingebiel and R. Marschalek (2009). "New insights to the MLL recombinome of acute leukemias." Leukemia **23**(8): 1490-1499.

Muntean, A. G. and J. L. Hess (2012). "The pathogenesis of mixed-lineage leukemia." Annu Rev Pathol **7**: 283-301.

Nagy, B., T. Lundán, M. L. Larramendy, Y. Aalto, Y. Zhu, T. Niini, H. Edgren, A. Ferrer, J. Vilpo, E. Elonen, K. Vettenranta, K. Franssila and S. Knuutila (2003). "Abnormal expression of apoptosis-related genes in haematological malignancies: overexpression of MYC is poor prognostic sign in mantle cell lymphoma." Br J Haematol **120**(3): 434-441.

Nakajima, W., K. Sharma, M. A. Hicks, N. Le, R. Brown, G. W. Krystal and H. Harada (2016). "Combination with vorinostat overcomes ABT-263 (navitoclax) resistance of small cell lung cancer." Cancer Biol Ther **17**(1): 27-35.

Nishioka, C., T. Ikezoe, A. Takeuchi, A. Nobumoto, M. Tsuda and A. Yokoyama (2015). "The novel function of CD82 and its impact on BCL2L12 via AKT/STAT5 signal pathway in acute myelogenous leukemia cells." Leukemia **29**(12): 2296-2306.

Niu, X., J. Zhao, J. Ma, C. Xie, H. Edwards, G. Wang, J. T. Caldwell, S. Xiang, X. Zhang, R. Chu, Z. J. Wang, H. Lin, J. W. Taub and Y. Ge (2016). "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." Clin Cancer Res **22**(17): 4440-4451.

Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi and N. Tanaka (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." Science **288**(5468): 1053-1058.

Olesinski, E. A. and S. Bhatt (2021). "Dynamic BH3 profiling method for rapid identification of active therapy in BH3 mimetics resistant xenograft mouse models." STAR Protoc **2**(2): 100461.

Ow, T. J., C. D. Fulcher, C. Thomas, P. O. Broin, A. Lopez, D. E. Reyna, R. V. Smith, C. Sarta, M. B. Prystowsky, N. F. Schlecht, B. A. Schiff, G. Rosenblatt, T. J. Belbin, T. M. Harris, G. C. Childs, N. Kawachi, C. Guha and E. Gavathiotis (2019). "Optimal targeting of BCL-family proteins in head and neck squamous cell carcinoma requires inhibition of both BCL-xL and MCL-1." Oncotarget **10**(4): 494-510.

Pillay, J., I. den Braber, N. Vrisekoop, L. M. Kwast, R. J. de Boer, J. A. Borghans, K. Tesselaar and L. Koenderman (2010). "In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days." Blood **116**(4): 625-627.

Potter, D. S., R. Du, P. Bhola, R. Bueno and A. Letai (2021). "Dynamic BH3 profiling identifies active BH3 mimetic combinations in non-small cell lung cancer." Cell Death Dis **12**(8): 741.

Potter, D. S. and A. Letai (2016). "To Prime, or Not to Prime: That Is the Question." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **81**: 131-140.

Pui, C. H., J. M. Chessells, B. Camitta, A. Baruchel, A. Biondi, J. M. Boyett, A. Carroll, O. B. Eden, W. E. Evans, H. Gadner, J. Harbott, D. O. Harms, C. J. Harrison, P. L. Harrison, N. Heerema, G. Janka-Schaub, W. Kamps, G. Masera, J. Pullen, S. C. Raimondi, S. Richards, H. Riehm, S. Sallan, H. Sather, J. Shuster, L. B. Silverman, M. G. Valsecchi, E. Vilmer, Y. Zhou, P. S. Gaynon and M. Schrappe (2003). "Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements." Leukemia **17**(4): 700-706.

Punnoose, E. A., J. D. Levenson, F. Peale, E. R. Boghaert, L. D. Belmont, N. Tan, A. Young, M. Mitten, E. Ingalla, W. C. Darbonne, A. Oleksijew, P. Tapang, P. Yue, J. Oeh, L. Lee, S. Maiga, W. J. Fairbrother, M. Amiot, A. J. Souers and D. Sampath (2016). "Expression Profile of BCL-2, BCL-XL, and MCL-1 Predicts Pharmacological Response to the BCL-2 Selective Antagonist Venetoclax in Multiple Myeloma Models." Mol Cancer Ther **15**(5): 1132-1144.

- Raghuram, N., D. Hasegawa, K. Nakashima, S. Rahman, E. Antoniou, T. Skajaa, P. Merli, A. Verma, K. R. Rabin, C. Aftandilian, R. S. Kotecha, D. Cheuk, K. Jahnukainen, A. Kolenova, W. Balwierz, A. Norton, M. O'Brien, S. Cellot, A. Chopek, N. Arad-Cohen, B. Goemans, M. Rojas-Vasquez, H. Ariffin, J. Bartram, E. A. Kolb, F. Locatelli, J.-H. Klusmann, H. Hasle, B. McGuire, A. Hasnain, L. Sung and J. Hitzler (2023). "Survival outcomes of children with relapsed or refractory myeloid leukemia associated with Down syndrome." Blood Advances **7**(21): 6532-6539.
- Rao, J., F. Li, R. Y. Zhang, H. H. Zhou and G. A. Chen (2017). "BH3 mimetic ABT-737 induces apoptosis in CD34(+) acute myeloid leukemia cells and shows synergistic effect with conventional chemotherapeutic drugs." Asia Pac J Clin Oncol **13**(2): e144-e152.
- Reinhardt, D., C. Von Neuhoff, A. Sander and U. Creutzig (2012). "[Genetic prognostic factors in childhood acute myeloid leukemia]." Klin Padiatr **224**(6): 372-376.
- Ribeiro, R. C. (2014). "Advances in treatment of de-novo pediatric acute myeloid leukemia." Curr Opin Oncol **26**(6): 656-662.
- Roberts, A. W., J. F. Seymour, J. R. Brown, W. G. Wierda, T. J. Kipps, S. L. Khaw, D. A. Carney, S. Z. He, D. C. Huang, H. Xiong, Y. Cui, T. A. Busman, E. M. McKeegan, A. P. Krivoshik, S. H. Enschede and R. Humerickhouse (2012). "Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease." J Clin Oncol **30**(5): 488-496.
- Robinson, B. W., K. C. Behling, M. Gupta, A. Y. Zhang, J. S. Moore, A. D. Bantly, C. L. Willman, A. J. Carroll, P. C. Adamson, J. S. Barrett and C. A. Felix (2008). "Abundant anti-apoptotic BCL-2 is a molecular target in leukaemias with t(4;11) translocation." Br J Haematol **141**(6): 827-839.
- Rongvaux, A., T. Willinger, J. Martinek, T. Strowig, S. V. Gearty, L. L. Teichmann, Y. Saito, F. Marches, S. Halene, A. K. Palucka, M. G. Manz and R. A. Flavell (2014). "Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model." Nat Biotechnol **32**(4): 364-372.
- Rubnitz, J. E. (2017). "Current Management of Childhood Acute Myeloid Leukemia." Pediatric Drugs **19**(1): 1-10.
- Ryan, J. and A. Letai (2013). "BH3 profiling in whole cells by fluorimeter or FACS." Methods **61**(2): 156-164.
- Singh, R., A. Letai and K. Sarosiek (2019). "Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins." Nat Rev Mol Cell Biol **20**(3): 175-193.
- Slany, R. K. (2009). "The molecular biology of mixed lineage leukemia." Haematologica **94**(7): 984-993.
- Sorrell, A. D., T. A. Alonzo, J. M. Hilden, R. B. Gerbing, T. W. Loew, L. Hathaway, D. Barnard, J. W. Taub, Y. Ravindranath, F. O. Smith, R. J. Arceci, W. G. Woods and A. S. Gamis (2012). "Favorable survival maintained in children who have myeloid leukemia associated with

Down syndrome using reduced-dose chemotherapy on Children's Oncology Group trial A2971: a report from the Children's Oncology Group." Cancer **118**(19): 4806-4814.

Stass, S., J. Mirro, S. Melvin, C. H. Pui, S. B. Murphy and D. Williams (1984). "Lineage switch in acute leukemia." Blood **64**(3): 701-706.

Suryani, S., H. Carol, T. N. Chonghaile, V. Frismantas, C. Sarmah, L. High, B. Bornhauser, M. J. Cowley, B. Szymanska, K. Evans, I. Boehm, E. Tonna, L. Jones, D. M. Manesh, R. T. Kurmasheva, C. Billups, W. Kaplan, A. Letai, J. P. Bourquin, P. J. Houghton, M. A. Smith and R. B. Lock (2014). "Cell and molecular determinants of in vivo efficacy of the BH3 mimetic ABT-263 against pediatric acute lymphoblastic leukemia xenografts." Clin Cancer Res **20**(17): 4520-4531.

Tse, C., A. R. Shoemaker, J. Adickes, M. G. Anderson, J. Chen, S. Jin, E. F. Johnson, K. C. Marsh, M. J. Mitten, P. Nimmer, L. Roberts, S. K. Tahir, Y. Xiao, X. Yang, H. Zhang, S. Fesik, S. H. Rosenberg and S. W. Elmore (2008). "ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor." Cancer Res **68**(9): 3421-3428.

Tutusaus, A., M. Stefanovic, L. Boix, B. Cucarull, A. Zamora, L. Blasco, P. G. de Frutos, M. Reig, J. C. Fernandez-Checa, M. Mari, A. Colell, J. Bruix and A. Morales (2018). "Antiapoptotic BCL-2 proteins determine sorafenib/regorafenib resistance and BH3-mimetic efficacy in hepatocellular carcinoma." Oncotarget **9**(24): 16701-16717.

Tyagi, A., R. Pramanik, R. Bakhshi, S. Vishnubhatla and S. Bakhshi (2019). "Apoptosis: A biomarker of high-risk phenotype in pediatric acute myeloid leukemia?" Int J Lab Hematol **41**(1): 141-147.

Uffmann, M., M. Rasche, M. Zimmermann, C. von Neuhoff, U. Creutzig, M. Dworzak, L. Scheffers, H. Hasle, C. M. Zwaan, D. Reinhardt and J. H. Klusmann (2017). "Therapy reduction in patients with Down syndrome and myeloid leukemia: the international ML-DS 2006 trial." Blood **129**(25): 3314-3321.

Umeda, M., J. Ma, T. Westover, Y. Ni, G. Song, J. L. Maciaszek, M. Rusch, D. Rahbarinia, S. Foy, B. J. Huang, M. P. Walsh, P. Kumar, Y. Liu, W. Yang, Y. Fan, G. Wu, S. D. Baker, X. Ma, L. Wang, T. A. Alonzo, J. E. Rubnitz, S. Pounds and J. M. Klco (2024). "A new genomic framework to categorize pediatric acute myeloid leukemia." Nat Genet **56**(2): 281-293.

Vandenberg, C. J. and S. Cory (2013). "ABT-199, a new Bcl-2-specific BH3 mimetic, has in vivo efficacy against aggressive Myc-driven mouse lymphomas without provoking thrombocytopenia." Blood **121**(12): 2285-2288.

Vaux, D. L., S. Cory and J. M. Adams (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." Nature **335**(6189): 440-442.

Vogler, M. (2012). "BCL2A1: the underdog in the BCL2 family." Cell Death Differ **19**(1): 67-74.

Wunderlich, M. and J. C. Mulloy (2016). "MISTRG extends PDX modeling to favorable AMLs." Blood **128**(17): 2111-2112.

Yamatani, K., T. Ai, K. Saito, K. Suzuki, A. Hori, S. Kinjo, K. Ikeo, V. Ruvolo, W. Zhang, P. Y. Mak, B. Kaczkowski, H. Harada, K. Katayama, Y. Sugimoto, J. Myslinski, T. Hato, T. Miida, M. Konopleva, Y. Hayashizaki, B. Z. Carter, Y. Tabe and M. Andreeff (2022). "Inhibition of BCL2A1 by STAT5 inactivation overcomes resistance to targeted therapies of FLT3-ITD/D835 mutant AML." Transl Oncol **18**: 101354.

Yamatani, K., T. Ai, K. Saito, H. Yang, V. Ruvolo, P. Y. Mak, S. Kinjo, K. Ikeo, H. Harada, K. Katayama, T. Miida, M. Konopleva, W. Zhang, B. Z. Carter, Y. Hayashizaki, M. Andreeff and Y. Tabe (2020). "BCL2A1: A Novel Target in Refractory Acute Myeloid Leukemia with FLT3-ITD/D835 Dual Mutations." Blood **136**(Supplement 1): 32-33.

Zhang, F., X. Yu, X. Liu, T. Zhou, T. Nie, M. Cheng, H. Liu, M. Dai and B. Zhang (2017). "ABT-737 potentiates cisplatin-induced apoptosis in human osteosarcoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway." Oncol Rep **38**(4): 2301-2308.

Zhang, H., Y. Nakauchi, T. Köhnke, M. Stafford, D. Bottomly, R. Thomas, B. Wilmot, S. K. McWeeney, R. Majeti and J. W. Tyner (2020). "Integrated analysis of patient samples identifies biomarkers for venetoclax efficacy and combination strategies in acute myeloid leukemia." Nat Cancer **1**(8): 826-839.

Zhang, L. N., J. Y. Li and W. Xu (2013). "A review of the role of Puma, Noxa and Bim in the tumorigenesis, therapy and drug resistance of chronic lymphocytic leukemia." Cancer Gene Ther **20**(1): 1-7.

Zhao, J., X. Niu, X. Li, H. Edwards, G. Wang, Y. Wang, J. W. Taub, H. Lin and Y. Ge (2016). "Inhibition of CHK1 enhances cell death induced by the Bcl-2-selective inhibitor ABT-199 in acute myeloid leukemia cells." Oncotarget **7**(23): 34785-34799.

Zhou, W., J. Xu, E. Gelston, X. Wu, Z. Zou, B. Wang, Y. Zeng, H. Wang, A. Liu, L. Xu and Q. Liu (2015). "Inhibition of Bcl-xL overcomes polyploidy resistance and leads to apoptotic cell death in acute myeloid leukemia cells." Oncotarget **6**(25): 21557-21571.

Zhu, F., J. L. Crombie, W. Ni, N. M. Hoang, S. Garg, L. Hackett, S. J. F. Chong, M. C. Collins, L. Rui, J. Griffin and M. S. Davids (2023). "Hypomethylating agent decitabine sensitizes diffuse large B-cell lymphoma to venetoclax." Haematologica.

11 Thesen

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Thesen der Dissertation

Evaluation neuer Therapieansätze für Myeloische Leukämie bei Kindern mit Down-Syndrom

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
für das Fachgebiet
Pädiatrie

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von David Agha-Mir-Salim geb. Samulowski

geboren am 26.09.1992 in Berlin

1. ABT-263 (Navitoclax) ist dazu in der Lage die Apoptose in Leukämiezellen der kindlichen AML auszulösen.
2. Der Subtyp der akuten myeloischen Leukämie bei Kindern mit Down-Syndrom (ML-DS) ist gegenüber einer Therapie mit ABT-263 refraktär.
3. Zur Evaluation der Effektivität einer Therapie mit ABT-263 kann prätherapeutisch eine Kombination aus Dosis-Wirkungs-Experimenten und BH3 Profiling herangezogen werden. Die Aussagekraft lässt sich durch Western Blot und mRNA Sequenzierung erhöhen.
4. In Abwesenheit von BCL-2 ist der therapeutische Effekt von ABT-263 durch die alleinige Inhibition von BCL-XL gering.
5. Hohe BCL-2 Spiegel wirken sich günstig auf die Therapie von kindlicher AML mit ABT-263 aus.
6. Die Abwesenheit typischer Resistenzmechanismen wie eine hohe Expression von BCL-XL und MCL-1 ist von großer Bedeutung für den Therapieerfolg mit ABT-263.
7. Eine pro-apoptotische Therapie ist eine vielversprechende Behandlungsoption bei *KMT2A* Aberration (KMT2Ar)
8. Die Gene *BCL2L1*, *MCL1*, *BCL2A1*, *BCL2L12*, *PMAIP1* und *TP53* sind von großer Bedeutung für das Ansprechen auf eine pro-apoptotische Therapie bei kindlicher Leukämie.

12 Anlagen

Tab. Aktivitätseinteilung der Mäuse







Score	Belastung	Körpergewicht	Allgemeinzustand	Verhalten
1	0 keine B.	+/- 5%; BC4 	Fell glatt, glänzend; Augen klar, glänzend; Körperöffnungen sauber	Sehr aktiv: munter, aufmerksam, neugierig, speziestypische Bewegungen
2	0 keine B.	Reduktion bis max. 10%; BC4 	Fell glatt, glänzend; Augen klar, glänzend Körperöffnungen sauber	Aktiv: aufmerksam, speziestypische Bewegungen
3	SV2 geringe B.	Reduktion bis max. 15%; BC3 	Fell matt, Felldefekte, Augen nicht mehr vollständig geöffnet	Weniger aktiv: aufmerksam, ruhig, verringerte Bewegung, arttypische Haltung, verminderte Körperpflege
4a	SV3 mittlere B.	Reduktion \leq 20%; BC3 	Fell stumpf, aufgestellt; Augen nicht mehr vollständig geöffnet, Körperöffnungen ungepflegt	Eingeschränkt: Tier ruhig, häufiges Verharren, eingeschränkte Reaktionen auf Umweltreize, kaum Körperpflege
4b	SV3 mittlere B.	eines oder mehrere der Kriterien aus Score 5 – Übergang Score 4 zu Score 5 → sofortiger Abbruch des Versuches / Abtöten des Zuchttieres		
5	SV4 schwere B.	Reduktion > 20%; BC2 	Fell aufgestellt/ schmutzig, Augen geschlossen Körperöffnungen verklebt oder feucht; gekrümmte Haltung;	Apathisch: Selbstisolation; keine nennenswerte Aktivität
6	SV4 schwere B.	BC1 	Augen geschlossen, Seitenlage, flache Atmung, Krämpfe, Tier kalt	Moribund (Tod zu erwarten): Keine Aktivität, keine Reaktion auf Umweltreize

Tabelle 2: Zytogenetik der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zytogenetik
CMK	human flat-moded hypotetraploid karyotype with 8% polyploidy - 85-90<4n>XY, -X, -Y, -2, -3, +5, -6, -6, -8, +11, -15, -15, +16, -17, -19, +21, +22, +7-11mar, add(1)(q31), add(1)(p36), add(3)(q11), del(3)(p14)x2-3, add(5)(q11), add(5)(q13), dup(8)(q11q21), add(8)(q13-21), del(8)(q11), del(9)(p21)x2, add(9)(q11)x2, del(10)(q22q24), der(11;17)(q10;q10), der(11)dup(11)(p13p15)t(5;11)(q11;p15)x1-2, del(11)(q23), add(12)(p13)x2, add(17)(p1?), add(18)(q23)x2-3, add(19)(p13), der(20)t(1;20)(q2?5;q1?2)x2, add(22)(q13) - disomic rearrangement of 20q1 close to common deleted segment, together with additional rearrangements of ch 20 present in markers - matches published karyotype
MO7e	human near-diploid karyotype - 46(45-46)<2n>XX, t(11;21)(p11;p13), add(13)(p13), add(22)(p13)
ML-2	human near tetraploid karyotype - 92(84-94)<4n>XX, -Y, -Y, -7, -9, -10, -10, +11, +12, +12, +13, +13, -15, -16, -17, -17, +18, +18, -20, -20, +4mar, der(1)t(1;?) (p21;?)x2, del(6)(q23)x2, der(6)t(6;11)(q27;?q23)x2, ?der(11)t(6;11)(q27;?q23)/del(11)(q23)x2, der(11)t(11;?) (?->11p11->11q23:)x2, der(11)t(11;?) (q11-13;?), dup(13)(q32->qter)x2, der(18)t(5;?;18)(q21;?;q11)x2 - extensive ch 11 rearrangements (inc. 11q23, typical of M4 and M5 AML) obscure the cytogenetic picture - ML-2 may carry rare t(6;11)
MOLM-13	human hyperdiploid karyotype with 4% polyploidy - 51(48-52)<2n>XY, +8, +8, +8, +13, del(8)(p1?p2?), ins(11;9)(q23;p22p23) - resembles published karyotype - sideline with idem, +19 - carries occult insertion effecting KMT2A-MLLT3 (MLL-MLLT3; MLL-AF9) fusion

www.dsmz.de, Abrufdatum: 11.10.2023

Tabelle 3: Zytogenetik der verwendeten Patientenzellen

PDX ID	Zytogenetik	Molekulargenetik
<u>KMT2Ar</u> <u>#1</u>	42~44,XY,t(6;11)(q27;q23)[cp2]/51,idem,+X,+der(6)t(6;11)(q27;q23),+8,+19,+21[5]	NRAS Mutation
<u>KMT2Ar</u> <u>#2</u>	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[8]/50,XX,idem,+3,+8,+18,+19[15]	k.A.
<u>KMT2Ar</u> <u>#3</u>	47,XX,+8,t(9;11)(p22;q23)	k.A.
<u>KMT2Ar</u> <u>#4</u>	46,XY[15].nuc ish 3q26(EVI1x2)[100/100],8q22(RUNX1T1x2),21q22(RUNX1x2)[98/100],11q23(MLLx2)[99/100],16q22(CBFBx2)[100/100],17q21.1(RARAx2)[100/100]	KMT2A Mutation
ML-DS #1	k.A.	k.A.
ML-DS #2	k.A.	GATA1 Mutation

ML-DS #3	k.A	k.A.
ML-DS #4	k.A.	NRAS Mutation

Anlage 1:

13 Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbstständigkeitserklärung

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Datum, Unterschrift

14 Danksagung

Mein aufrichtiger und herzlicher Dank geht an meine Frau Lisa, die mich nicht nur bei meiner Forschungsarbeit, sondern auch in allen anderen Lebensbereichen bedingungslos unterstützt.

Ich möchte mich zudem bei all jenen Personen bedanken, die mich über diese lange Zeit begleitet haben. Insbesondere möchte ich Herr Prof. Jan-Henning Klusmann, Frau Priv.-Doz. Jessica Höll und Herr Dr. Raj Bhayadia für ihre herausragende Betreuung und den wissenschaftlichen Anspruch danken, den sie an mich gestellt haben. Ihre Unterstützung und Anleitung waren von unschätzbarem Wert und haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Auch möchte ich die großzügige Unterstützung durch das Promotionsstipendium der Kind-Philipp-Stiftung für hämatologisch-onkologische Forschung würdigen. Ohne diese finanzielle Unterstützung wäre die Realisierung dieses Projekts in dieser Form nicht möglich gewesen.

Ein herzliches Dankeschön geht an die Mitglieder der AG Klusmann, deren fachlicher Austausch und Engagement die Qualität meiner Arbeit maßgeblich beeinflusst haben.

Es war mir eine Ehre, mit Ihnen allen zusammenzuarbeiten und ich bin dankbar für die wertvollen Erfahrungen, die ich während dieses Forschungsprojekts sammeln durfte.