



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

III. Medizinische Klinik für Hämatologie

und internistische Onkologie

Klinikum rechts der Isar

**Inhibition von PLK1 als therapeutische Strategie für Patienten mit
myelodysplastischen Syndromen (MDS) und sekundären akuten
myeloischen Leukämien (sAML)**

Johanna Kauschinger

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Philipp J. Jost
2. Priv.-Doz. Dr. Julia Slotta-Huspenina

Die Dissertation wurde am 16.07.2019 bei der Technischen Universität München ein-
gereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.12.2019 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 1

1 EINLEITUNG 4

 1.1 Myelodysplastische Syndrome..... 4

 1.1.1 Definition und Epidemiologie 4

 1.1.2 Symptomatik..... 4

 1.1.3 Pathophysiologie 5

 1.1.4 Diagnostik und Stadieneinteilung 5

 1.1.5 Prognose und Therapie 11

 1.2 Deregulierter Zellzyklus als Schlüsselmerkmal und therapeutischer Ansatzpunkt
 von malignen Erkrankungen 15

 1.2.1 Die Familie der polo-like Kinasen 16

 1.2.2 Veränderungen der PLK in malignen Zellen 17

 1.2.3 Inhibition von PLK1 17

 1.2.4 Klinische Erprobung von Volasertib 19

2 PROBLEMSTELLUNG 20

3 MATERIAL UND METHODEN 21

 3.1 Material 21

 3.1.1 Geräte 21

 3.1.2 Chemikalien und biogene Substanzen 22

 3.1.3 Standardlösungen und Puffer..... 23

 3.1.4 Zellkulturmedien und Medienzusätze 24

 3.1.5 Antikörper, Inhibitoren und Kits 25

 3.1.6 Verbrauchsmaterialien 26

 3.1.7 Werkzeug 26

 3.1.8 Software 27

 3.2 Methoden 28

 3.2.1 Gewinnung von Probenmaterial 28

 3.2.2 Gewinnung von Kontrollmaterial 28

 3.2.3 Aufreinigung von primärem Material 29

 3.2.4 Anreicherung von CD34⁺ mononukleären Knochenmarkszellen 29

 3.2.5 Inkubation mit dem PLK1-Inhibitor 30

3.2.6	Viabilitätsmessung mittels Durchflusszytometrie	30
3.2.7	Koloniebildungsassay	30
3.2.8	Proliferationsmessung <i>in vitro</i> mittels CFSE	31
3.2.9	Mutationsanalysen	32
3.2.10	Genexpressionsanalysen	32
3.2.11	Proliferationsmessung mittels Ki-67	33
3.2.12	Quantifizierung des MCL-1-Proteinlevels mittels Durchflusszytometrie	33
3.2.13	Statistische Analyse	34
4	ERGEBNISSE	35
4.1	Beschreibung des Patientenkollektivs	35
4.2	Identifizierung der MDS-Stamm-/Vorläuferzelle	38
4.3	Nachweis erhöhter <i>PLK1</i> -Expression im Knochenmark von MDS-Patienten mittels Genexpressionsanalysen	39
4.4	Nachweis erhaltener Proliferationskapazität im seneszenten Knochenmark	41
4.5	Effektive Hemmung von Zellteilung durch Volasertib <i>in vitro</i>	42
4.6	Induktion von Zelltod durch Volasertib in CD34 ⁺ Knochenmarkszellen von Patienten mit MDS und sAML	45
4.7	Reduktion der Kolonienbildungsfähigkeit durch Volasertib	47
4.8	Schonung der gesunden Hämatopoese durch niedrigdosiertes Volasertib	48
4.9	Induktion von Zelltod und Reduktion der Kolonienbildungsfähigkeit durch niedrigdosiertes Volasertib in CD34 ⁺ Zellen der MDS- und sAML-Patienten	52
4.10	Der Effekt von niedrigdosiertem Volasertib beruht sowohl auf Zelltodinduktion als auch auf Proliferationshemmung	54
4.11	Dosisabhängige Toxizität des selektiven <i>PLK1</i> -Inhibitors GSK461364A auf die gesunde Knochenmarkszelle	56
4.12	MCL-1 als potenzieller Biomarker für das Ansprechen auf Volasertib	57
5	DISKUSSION	59
5.1	Bewertung des verwendeten Patienten- und Kontrollkollektivs	59
5.2	Inhibition von <i>PLK1</i> induziert Zelltod und reduziert die Kolonienbildung	60
5.3	Bedeutung der Selektivität von verschiedenen <i>PLK</i> -Inhibitoren für gesundes und krankes Knochenmark	61
5.4	Drastische Dosisreduktion von Volasertib verringert kritische Hämatotoxizität bei erhaltener Wirksamkeit	63
5.5	Volasertib mit gezielter Wirkung auf Stamm-/Vorläuferzelle von MDS- und sAML-Patienten	64

5.6	Das anti-apoptotische Protein MCL-1 als vielversprechender Biomarker für Volasertibsensitivität	65
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	67
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	69
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	87
9	TABELLENVERZEICHNIS	88
10	DANKSAGUNG	89

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
7-AAD	7-Aminoactinomycin
AML	Akute myeloische Leukämie
ANOVA	Analysis of variance
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	Aqua destillata
ASXL1	Additional sex combs-like 1
ATP	Adenosintriphosphat
ATRX	Alpha-thalassemia X-linked Mental Retardation
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-w	Bcl-2-like protein 2
BCL-xL	B-cell lymphoma-extra large
BFU-E	Burst-forming unit - Erythrocyte
BIT	Bovine serum albumin, insulin, transferrin
BMMNC	Bone marrow mononuclear cells
BSA	Bovine serum albumin
CaCl₂	Calciumchlorid
CBLB	Casitas B-lineage Lymphoma B
CD	Cluster of differentiation
CEBPA	CCAAT enhancer binding protein alpha
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CFU-GEMM	Colony-forming unit - Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage, Megakaryocyte
CFU-GM	Colony-forming unit - Granulocyte, Macrophage
CKIT	Tyrosinkinase KIT
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
EB	Excess of blasts

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FTL3	Fms related tyrosine kinase 3
h	Hour(s)
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
IC₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IDH1	Isocitrat-Dehydrogenase 1
IDH2	Isocitrat-Dehydrogenase 2
IE	Internationale Einheit
II	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IPSS	International Prognostic Scoring System
IPSS-R	Revised International Prognostic Scoring System
JAK2	Januskinase 2
KRAS	Kirsten rat sarcoma
LDAC	Low-dose cytarabine
LDL	Low density lipoprotein
MACS	Magnetic activated cell sorting
MCL-1	Myeloid cell leukemia -1
MDS	Myelodysplastische Syndrome
MFI	Mean fluorescence intensity
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLD	Multilineäre Dysplasie
MPL	Myeloproliferative leukemia protein
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
nl	Nanoliter

nM	Nanomolar
NPM1	Nucleophosmin 1
NRAS	Neuroblastoma RAS
PBS	Phosphate-buffered saline
PC5	Phycoerythrin cyanin 5.1
PE	Phycoerythrin
pHH3	Phosphoryliertes Histon H3
PLK	Polo-like kinase
PTPN11	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
RAS	Rat sarcoma
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RS-MLD	Multilineäre Dysplasie mit Ringsideroblasten
RS-SLD	Dysplasie einer Zellreihe mit Ringsideroblasten
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
sAML	Sekundäre akute myeloische Leukämie
SCF	Stem cell factor
SF3B1	Splicing factor 3b subunit 1
SLD	Dysplasie einer Zellreihe
SRSF2	Serine/arginine-rich splicing factor 2
TET2	Tet methylcytosine dioxygenase 2
tMDS	Therapieassoziierte myelodysplastische Syndrome
TP53	Tumor protein p53
U2AF1	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
WHO	World Health Organisation
WPSS	WHO Classification-Based Prognostic Scoring System
WT1	Wilms tumor 1
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1 EINLEITUNG

1.1 Myelodysplastische Syndrome

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Myelodysplastische Syndrome (MDS) bilden eine Gruppe klonaler Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzelle, die sich durch ineffektive Hämatopoese mit Dysplasiezeichen im Knochenmark und peripheren Zytopenien auszeichnen. Sie sind charakterisiert durch genetische Instabilität und einem erhöhten Risiko der Transformation in eine akute myeloische Leukämie (AML) im Verlauf der Erkrankung (Tefferi et al., 2009). Sie können sowohl *de novo* als auch sekundär nach Radio- oder Chemotherapie als therapieassoziiertes MDS (tMDS) entstehen (Corey et al., 2007). Die Prävalenz der Erkrankung ist im Rahmen der aktuellen demographischen Entwicklung steigend, da vor allem ältere Menschen betroffen sind (Corey et al., 2007). Das mediane Alter bei Diagnosestellung beträgt 76 Jahre (Ma et al., 2007). Die Inzidenz wird mit vier Fällen pro 100.000 angegeben und steigt auf bis zu 50 Fälle pro 100.000 bei über 70-Jährigen an (Neukirchen et al., 2011). Damit gehören sie zu den häufigsten hämatologischen Malignomen des älteren Menschen (Germing et al., 2013). Männer sind mit ca. 55% aller MDS-Fälle etwas häufiger betroffen als Frauen (Rollison et al., 2008; Neukirchen et al., 2011).

1.1.2 Symptomatik

MDS sind besonders im Frühstadium durch meist unspezifische Symptome gekennzeichnet, die sich dann als Symptome peripherer Zytopenien herausstellen. Am häufigsten zeigt sich dabei insbesondere als Erstsymptom eine Anämie mit Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Blässe. Eine Leukozytopenie bedingt eine höhere Infektanfälligkeit, jedoch kann es auch bei normwertigen Leukozyten durch eine Dysfunktion der Zellen zu vermehrten Infekten kommen (Toma et al., 2012). Erniedrigte Thrombozytenzahlen können mit Blutungen einhergehen (Ades et al., 2014). Aufgrund eines geschärften Bewusstseins werden MDS zunehmend auch im Rahmen von hausärztlichen Routinekontrollen diagnostiziert, wenn sich im Blutbild Auffälligkeiten ergeben.

1.1.3 Pathophysiologie

Für die Pathogenese von MDS spielt eine Vielzahl von genetischen Veränderungen eine Rolle. Dazu gehören vor allem chromosomale und molekulargenetische Veränderungen. Auf zytogenetischer Ebene sind die häufigsten Aberrationen die Deletion des Chromosoms 5q, die Deletion des Chromosoms 7/7q, die Trisomie 8, die Deletion des Chromosoms 20q und die Deletion des Y-Chromosoms (Bernasconi et al., 2005; Nimer, 2008; Bejar et al., 2011a; Raza et al., 2012; Bernasconi et al., 2013). Zu den häufigsten molekulargenetischen Veränderungen zählen Mutationen in den Genen *TET2*, *RUNX1*, *TP53*, *ASXL1*, *NRAS/KRAS* und *EZH2*. Seltener sind hingegen Aberrationen der Gene *CBL/CBLB*, *JAK2*, *MPL*, *ATRX*, *NPM1*, *IDH1*, *IDH2*, *CEBPA*, *WT1*, *PTPN11*, *FLT3*, *CSF1R* und *CKIT* (Bejar et al., 2011a; Ades et al., 2014; Shallis et al., 2018). Die Mutationen in den Genen *TP53*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1* und *ASXL1* sind zudem mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Bejar et al., 2011b). Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei MDS-Patienten häufig Mutationen im Spliceosom vorliegen. Dazu zählen *U2AF1*, *ZRSF2*, *SRSF2* und *SF3B1* (Yoshida et al., 2011). 20% der Patienten tragen eine *SF3B1*-Mutation. Diese ist assoziiert mit dem Vorhandensein von Ringsideroblasten, weniger Zytopenien und einer besseren Prognose (Papaemmanuil et al., 2011). Auch immunologische Vorgänge (Fujii et al., 2003; Kordasti et al., 2007; Kordasti et al., 2009; Costantini et al., 2013) und Veränderungen der Epigenetik (Khan et al., 2013) werden als pathogenetische Faktoren diskutiert.

1.1.4 Diagnostik und Stadieneinteilung

Erste Hinweise für MDS ergeben sich häufig im Rahmen von Routineuntersuchungen. Hier fallen im Blutbild periphere Zytopenien auf. Neben der Untersuchung von peripherem Blut mit Differenzialblutbild gehört eine Untersuchung des Knochenmarks zu den wichtigsten diagnostischen Methoden. Im Mittelpunkt steht hier die Zytomorphologie zur Identifikation von Dysplasiezeichen, die mindestens 10% aller kernhaltigen Zellen in einer oder mehreren Zellreihen aufweisen müssen (Germing et al., 2012), sowie zur Bestimmung des Anteils der Ringsideroblasten und Blasten. Der Blastenanteil sollte auch im peripheren Blut

ermittelt werden. Diese Parameter gehen in die WHO-Klassifikation myelodysplastischer Syndrome von 2016 (Tabelle 1) ein. Ein Blastenanteil $\geq 20\%$ im Knochenmark oder peripheren Blut definiert nach WHO eine AML (Arber et al., 2016). Im Hinblick auf prognostische Faktoren ist bei MDS zwischen frühen (SLD, RS-SLD, MLD und RS-MLD) und späten Krankheitsstadien (EB1 und EB2) zu unterscheiden.

Erworbene zytogenetische Veränderungen sind wichtige prognostische Faktoren für Patienten mit MDS (Knapp et al., 1985; Toyama et al., 1993; Greenberg et al., 1997; Sole et al., 2005; Greenberg et al., 2012; Schanz et al., 2012). Außerdem kann mit dem Nachweis MDS-typischer zytogenetischer Veränderungen die Diagnose erhärtet werden, wenn nach zytomorphologischer Untersuchung noch Differenzialdiagnosen offen bleiben (Bacher et al., 2009). Deshalb gehört eine Chromosomenanalyse zu den essenziellen diagnostischen Maßnahmen. Bei etwa 40 - 60% aller *de novo* MDS-Patienten lassen sich chromosomale Veränderungen nachweisen (Greenberg et al., 1997; Bernasconi et al., 2005; Sole et al., 2005; Pozdnyakova et al., 2008; Schanz et al., 2012; Bernasconi et al., 2013).

Zur Risikostratifizierung wurden mehrere Klassifikationssysteme entwickelt. Bedeutend sind das International Prognostic Scoring System (IPSS) (Greenberg et al., 1997), das überarbeitete International Prognostic Scoring System (IPSS-R) (Greenberg et al., 2012) und das World Health Organization (WHO) Classification-Based Prognostic Scoring System (WPSS) (Vardiman et al., 2009). In das IPSS gehen der Blastenanteil im Knochenmark, die Anzahl der Zytopenien und der Karyotyp ein (Tabelle 2). Das IPSS wurde im Jahr 2012 überarbeitet und um die Kriterien „Ausmaß der Anämie“ und „Anzahl von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten“ zum IPSS-R erweitert (Tabelle 3). Die zytogenetischen Risikogruppen für den IPSS-R (Schanz et al., 2012) sind in Tabelle 4 dargestellt.

Zusätzliche Risikofaktoren wie der Transfusionsbedarf und das Vorhandensein von Dysplasien wurden gefunden und in den WPSS integriert, der in fünf Risikogruppen unterteilt wird und das Überleben sowie die Wahrscheinlichkeit einer Progression in eine AML vorhersagen kann (Malcovati et al., 2007). Eine Übersicht über den WPSS bietet Tabelle 5.

Tabelle 1: WHO-Klassifikation myelodysplastischer Syndrome von 2016 (Arber et al., 2016)

Der MDS-Subtyp wird in der WHO-Klassifikation durch die Anzahl der peripheren Zytopenien, den Blastenanteil im peripheren Blut, den Knochenmarksbefund und die Zytogenetik definiert.

MDS-Subtyp	Anzahl peripherer Zytopenien*	Blastenanteil im peripheren Blut (in %)	Knochenmarksbefund und Zytogenetik
MDS mit Dysplasie in einer Zellreihe (MDS SLD)	1-2	< 1	Blasten < 5%, keine Auerstäbchen, < 15% Ringsideroblasten, Dysplasiezeichen in einer Zellreihe
MDS mit Dysplasie in mehreren Zellreihen (MDS MLD)	1-3	< 1	Blasten < 5%, keine Auerstäbchen, < 15% Ringsideroblasten, Dysplasiezeichen in zwei oder drei Zellreihen
MDS mit Dysplasie in einer Zellreihe und Ringsideroblasten (MDS RS-SLD)	1-2	< 1	Blasten < 5%, keine Auerstäbchen, Dysplasiezeichen in einer Zellreihe, > 15% Ringsideroblasten oder > 5% Ringsideroblasten und SF3B1-Mutation
MDS mit Dysplasie in mehreren Zellreihen und Ringsideroblasten (MDS RS-MLD)	1-3	< 1	Blasten < 5%, keine Auerstäbchen, Dysplasiezeichen in zwei oder drei Zellreihen, > 15% Ringsideroblasten oder > 5% Ringsideroblasten und SF3B1-Mutation
MDS mit del(5q)	1-2	< 1	Blasten < 5%, keine Auerstäbchen, del(5q) allein oder mit einer weiteren zytogenetischen Anomalie (nicht das Chromosom 7 betreffend)
MDS mit Blastenexzess 1 (MDS EB1)	1-3	< 5	Blasten 5 - < 10%, keine Auerstäbchen
MDS mit Blastenexzess 2 (MDS EB2)	1-3	< 20	Blasten 10 - < 20%, Auerstäbchen möglich
MDS unklassifiziert	1-3	< 1	Blasten < 5%, keine Auerstäbchen

* Periphere Zytopenien sind definiert als Hämoglobin < 10 g/dl, Thrombozyten < 100 x 10⁹/l, neutrophile Granulozyten < 1,8 x 10⁹/l

Tabelle 2: International Prognostic Scoring System (IPSS) für myelodysplastische Syndrome (Greenberg et al., 1997)

Aus der Summe der Punktwerte der prognostischen Parameter Blasten im Knochenmark, Anzahl der Zytopenien und Karyotyp ergibt sich die Risikogruppe des IPSS.

Prognostischer Parameter	Punktwert				
	0	0,5	1	1,5	2
Blasten im Knochenmark (in %)	0 - 4	5 - 10	-	11 - 20	21 - 29
Anzahl der Zytopenien ¹	0 - 1	2 - 3	-	-	-
Karyotyp ²	günstig	intermediär	ungünstig	-	-

¹Periphere Zytopenien sind definiert als Hämoglobin < 10 g/dl, Thrombozyten < 100/nl, neutrophile Granulozyten < 1,8/nl

²günstig: normaler Karyotyp, -5q, -20q, -Y; ungünstig: komplexer Karyotyp mit 3 ≥ Aberrationen, Anomalien von Chromosom 7; intermediär: alle weiteren Aberrationen

Gesamtpunktzahl	Risikogruppe
0	niedriges Risiko
0,5 – 1	mittleres Risiko 1
1,5 - 2	mittleres Risiko 2
≥ 2,5	hohes Risiko

Tabelle 3: Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) für myelodysplastische Syndrome (Greenberg et al., 2012)

Aus der Summe der Punktwerte der prognostischen Parameter Karyotyp, Blasten im Knochenmark, Hämoglobin (in g/dl), Thrombozyten (pro nl) und neutrophile Granulozyten (pro nl) ergibt sich die Risikogruppe des IPSS-R (int. = intermediär). Das Überleben kann anhand der Risikogruppe abgeschätzt werden.

Prognostischer Parameter	Punktwert						
	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Karyotyp ¹	sehr günstig	-	günstig	-	int.	ungünstig	sehr ungünstig
Blasten im Knochenmark (in %)	< 2	-	2 - < 5	-	5 - 10	> 10	-
Hämoglobin (in g/dl)	> 10	-	8 - 10	< 8	-	-	-
Thrombozyten (pro nl)	> 100	50 - 100	< 50	-	-	-	-
Neutrophile Granulozyten (pro nl)	> 0,8	< 0,8	-	-	-	-	-

¹Zytogenetische Risikogruppe siehe Tabelle 4

Gesamtpunktzahl	Risikogruppe	Medianes Überleben (in Jahren)
0 - 1,5	sehr niedrig	8,8
> 1,5 - 3	niedrig	5,3
> 3 - 4,5	intermediär	3,0
> 4,5 - 6	hoch	1,6
> 6	sehr hoch	0,8

Tabelle 4: Zytogenetische Risikogruppen des IPSS-R (Schanz et al., 2012)

Anhand des Karyotyps kann das zytogenetische Risiko eingeschätzt werden. Die Risikogruppe geht als prognostischer Parameter in die Berechnung des IPSS-R ein.

Zytogenetische Risikogruppe				
sehr günstig	günstig	intermediär	ungünstig	sehr ungünstig
<u>einzel:</u> del(11q) -Y	<u>einzel:</u> normal del(5q) del(12p)	<u>einzel:</u> del(7q) +8 i(17q) +19 andere unabhängige Klone	<u>einzel:</u> inv(3)/t(3q)/del(3q) -7	-
-	<u>zwei:</u> del(5q) mit weiterer Aberration	<u>zwei:</u> ohne del(5q)/del(7q)	<u>zwei:</u> -7/del(7q) mit weiterer Aberration	-
-	-	-	<u>komplex:</u> 3 Aberrationen	<u>komplex:</u> > 3 Aberrationen

Tabelle 5: WHO Classification-based Prognostic Scoring System (Malcovati et al., 2007)

Aus der Summe der Punktwerte der prognostischen Parameter WHO-Kategorie, Karyotyp und Transfusionsbedarf ergibt sich die Risikogruppe des WPSS.

Prognostischer Parameter	Punktwert			
	0	1	2	3
WHO-Kategorie	(RS-)SLD, del(5q)	(RS-)MLD	EB1	EB2
Karyotyp¹	günstig	intermediär	ungünstig	-
Transfusionsbedarf	nein	regelmäßig ²		
¹ Günstig: normaler Karyotyp, -5q, -20q, -Y; ungünstig: komplexer Karyotyp mit 3 ≥ Aberrationen, Anomalien von Chromosom 7; intermediär: alle weiteren Aberrationen ² Mindestens eine Transfusion alle acht Wochen über einen Verlauf von vier Monaten				
Gesamtpunktzahl	Risikogruppe			
0	sehr niedriges Risiko			
1	niedriges Risiko			
2	mittleres Risiko			
3 - 4	hohes Risiko			
5 - 6	sehr hohes Risiko			

1.1.5 Prognose und Therapie

MDS sind eine Gruppe von Erkrankungen mit sehr variabler Prognose. In Frühstadien ist sie in der Regel gut, wodurch eine annähernd der Normalbevölkerung entsprechenden Lebenserwartung vorliegen kann, wohingegen bei Hochrisikoverläufen mit Transformation in eine AML die Überlebenszeit deutlich verkürzt ist (Greenberg et al., 2012). Zur Abschätzung der Überlebenszeit und des Risikos einer Entwicklung einer AML können IPSS, IPSS-R und WPSS herangezogen werden. Die mediane Überlebenszeit variiert zwischen 103 Monaten bei sehr niedrigem WPSS und 12 Monaten bei hohem WPSS (Malcovati et al., 2007). Sekundäre MDS - insbesondere nach Chemotherapie - haben aufgrund der komplexeren Zytogenetik und des damit einhergehenden, schlechteren Therapieansprechens in der Regel eine ungünstigere Prognose (Ades et al., 2014). Risikoadaptierte und individuelle Therapiestrategien sind aufgrund der variablen klinischen Verläufe obligat (Malcovati et al., 2013). Bei vielen Patienten mit Niedrigrisiko-MDS (IPSS niedriges und mittleres Risiko 1) ohne ausgeprägten

Zytopenien kann eine „Watch and Wait“-Strategie angewandt werden. Liegt ein sehr niedriger WPSS vor, besteht im Vergleich zur Normalbevölkerung keine signifikant höhere Mortalität (Malcovati et al., 2007). Da insbesondere bei älteren Patienten eine Anämie mit einer erhöhten Hospitalisationsrate und Mortalität einhergeht (Culleton et al., 2006), stellt die symptomatische Anämie eine Therapieindikation dar. Es sollten Transfusionen von Erythrozytenkonzentraten gegebenenfalls in Kombination mit Eisenchelatoren (Deferoxamin, Deferasirox) als supportive Maßnahmen durchgeführt werden. Im Falle von klinischen Blutungszeichen ist die Gabe von Thrombozytenkonzentraten indiziert. Relevante Blutungen sind jedoch erst ab einem Thrombozytenwert $< 10/\text{nl}$ im Blut zu erwarten. Bei schweren Blutungen kann zusätzlich eine Therapie mit Tranexamsäure erwogen werden. Bei infektiösen Komplikationen werden bedarfsweise Antiinfektiva gegeben. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer Therapie mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren. Von Erythropoetin profitieren insbesondere Niedrigrisiko-Patienten mit Erythropoetinspiegel $< 100 - 500 \text{ IE/ml}$ und niedrigem Transfusionsbedarf (höchstens zwei Erythrozytenkonzentrate innerhalb von acht Wochen). Die Kombination mit Granulozyten-Kolonien stimulierendem Faktor steigert die Wirkung der erythropoetischen Wachstumsfaktoren (Hellstrom-Lindberg et al., 1997). Eine Senkung von Blutungskomplikationen durch die Erhöhung der Thrombozytenzahl kann bei Niedrigrisiko-MDS durch thrombopoetische Wachstumsfaktoren erzielt werden (Fenaux et al., 2017). Zu den entsprechenden Präparaten gehören Romiplostim und Eltrombopag.

In Europa liegt für MDS mit Niedrig- oder Intermediär-1-Risiko, die neben einer isolierten Deletion des Chromosoms 5 eine transfusionspflichtige Anämie aufweisen, eine Zulassung für das Medikament Lenalidomid vor, wenn andere Therapiemöglichkeiten nicht möglich oder ausgeschöpft sind. Bei ca. zwei Drittel der Patienten kann mit der Substanz eine Aufhebung der Transfusionsabhängigkeit und in 50 - 70% der Fälle eine komplette zytogenetische Remission erreicht werden (List et al., 2006; Fenaux et al., 2011; Ades et al., 2014).

Die einzige kurative Therapie für Patienten mit Hochrisiko-MDS, mit der langfristig Remissionen erzielt werden können, ist die allogene Stammzelltransplantation

(Chang et al., 2007; Warlick et al., 2009). Für diese Patienten konnte eine Verlängerung des Gesamtüberlebens von 4,9 auf 6,1 Monate erzielt werden (Cutler et al., 2004). Eine allogene Stammzelltransplantation ist jedoch aufgrund des meist fortgeschrittenen Alters und den damit einhergehenden Komorbiditäten der Patienten nur limitiert durchführbar. Es sollte eine individuelle Entscheidung je nach Alter, Komorbiditäten, Lebenserwartung und Risikogruppe erfolgen. Die Therapie ist grundsätzlich bei Patienten bis zu einem Alter von 65 - 70 Jahren in Erwägung zu ziehen, wenn keine relevanten Begleiterkrankungen vorliegen (Malcovati et al., 2013). Jedoch sind lediglich 25% der MDS-Patienten jünger als 60 Jahre (Greenberg et al., 1997) und kommen grundsätzlich für diese Therapieform in Frage. Das 4-Jahres-Überleben nach allogener Stammzelltransplantation beträgt 31% (Lim et al., 2010).

Für Patienten mit Hochrisiko-MDS, die nicht für eine allogene Stammzelltransplantation in Frage kommen, ist die Standardtherapie die hypomethylierende Substanz Azacitidin. Dabei handelt es sich um ein Pyrimidin-Analogon, das anstelle von Zytosin in DNA eingebaut wird und durch kovalente Bindung an DNA-Methyltransferasen eine Methylierung verhindert (Leone et al., 2002; Grovdal et al., 2014; Pleyer et al., 2015). Zusätzlich hat es in höheren Dosierungen zytotoxische Wirkung (Christman, 2002). Durch Azacitidin konnte die Prognose der Hochrisiko-Patienten in den letzten Jahren deutlich verbessert werden. In zwei großen randomisierten Studien wurde eine deutliche Überlegenheit von Azacitidin im Vergleich zu konventionellen Therapieformen gezeigt (Silverman et al., 2002; Fenaux et al., 2009). Das mediane Überleben konnte von 15,0 Monaten unter konventioneller Therapie auf 24,5 Monate unter Azacitidin verlängert werden (Fenaux et al., 2009). Außerdem verlängert der Wirkstoff die Zeit bis zur Transformation in eine AML (nach sechs Monaten 3% unter Azacitidin vs. 24% unter supportiver Therapie) (Silverman et al., 2002). Die Dauer des Therapieansprechens liegt jedoch bei nur wenigen Monaten (Fenaux et al., 2009; Fenaux et al., 2010; Kadia et al., 2011) und die 2-Jahresüberlebensrate wird mit 15% angegeben (Prébet et al., 2011). Bei Versagen von Azacitidin kann der ebenfalls hypomethylierende Wirkstoff Decitabin gegeben werden (Kadia et al., 2011). Azacitidin wird darüberhinaus auch

als Therapie zur Überbrückung der Zeit bis zur allogenen Stammzelltransplantation eingesetzt (Murakami et al., 2017; Voso et al., 2017).

Zudem ist der BCL-2-selektive Inhibitor ABT-199 in Erprobung, der Effektivität bei Hochrisiko-MDS-Patienten bewiesen hat (Jilg et al., 2015). Weiterhin sind Kombinationstherapien aus Azacitidin und Lenalidomid bzw. Azacitidin und ABT-199 wirksam (DiNardo et al., 2015; DiNardo et al., 2018).

In der Gesamtschau zeigt sich deshalb, dass trotz verbesserter Therapiestrategien in der Vergangenheit die Prognose für Patienten mit Hochrisiko-MDS ungünstig bleibt, weshalb dringend neue Therapien benötigt werden.

1.2 Deregulierter Zellzyklus als Schlüsselmerkmal und therapeutischer Ansatzpunkt von malignen Erkrankungen

Bösartige Neubildungen sind nach den Erkrankungen des Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland [(Statistisches Bundesamt (Destatis), 2017)]. Zudem wird erwartet, dass die Häufigkeit von Tumoren sowohl aufgrund der wachsenden und älter werdenden Gesellschaft als auch aufgrund der zunehmenden Prävalenz von bekannten Risikofaktoren wie inhalativer Nikotinkonsum, Übergewicht und körperliche Inaktivität weltweit weiter zunehmen wird (Ferlay et al., 2007; Torre et al., 2015). Diese Entwicklung stellt die Wissenschaft vor neue Herausforderungen. Obwohl durch zytostatische Therapien die Krebssterblichkeit seit 1990 kontinuierlich sinkt (DeVita et al., 2008), besteht der Anspruch, den Einsatz von konventionellen, unspezifischen Chemotherapien mit ausgeprägten Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Haarausfall, Durchfall und Stomatitis (Basch et al., 2014) durch zielgerichtete Therapien zu ersetzen. Zu den etablierten Therapien der konventionellen Chemotherapien, die mit antimetabolischer Wirkung in die Zellzyklusregulation eingreifen, gehören unter anderem Taxane oder Vincaalkaloide (Jordan et al., 2004). Jedoch wirken diese Wirkstoffe auch auf sich nicht-teilende Zellen, was zum Beispiel zu ausgeprägter Neurotoxizität führen kann.

Neue Erkenntnisse in der Entstehung von Tumoren (Karzinogenese) und deren molekularbiologischen Eigenschaften schaffen die Voraussetzungen für neue Therapieformen mit dem Ziel einer personalisierten Medizin, um bösartige Neubildungen gezielter und nebenwirkungsärmer zu bekämpfen. Einen Durchbruch in der modernen Tumormedizin brachte der BCR-ABL Tyrosin-Kinase-Hemmer Imatinib, der bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie dauerhaft tiefe molekulare Remissionen erzielt (O'Brien et al., 2003).

Die Dysregulation des Zellzyklus stellt einen entscheidenden Mechanismus in der Entstehung von Tumoren dar (Malumbres et al., 2009; Yang et al., 2015) und wird als eines der Schlüsselmerkmale von Malignomen („Hallmarks of Cancer“) bezeichnet (Hanahan et al., 2000; Hanahan et al., 2011). In den Vorläuferzellen von Tumoren entstehen Aberrationen in den Signaltransduktionswegen der Zellteilung, die zur unkontrollierten Proliferation der Zellen führen (Malumbres et al., 2001;

Massague, 2004). Zusammen mit genetischer Instabilität, weiteren Mutationen und chromosomalen Aberrationen führt die unkontrollierte Proliferation zur Progression des Tumors (Kastan et al., 2004; Kops et al., 2005; Malumbres et al., 2009). Auch MDS weisen neben genetischer Instabilität, zytogenetischen und chromosomalen Veränderung ein Knochenmark mit gesteigerter Proliferationsrate auf (Parker et al., 2000; Alexandrakis et al., 2004; Matarraz et al., 2012).

1.2.1 Die Familie der polo-like Kinasen

Die Gruppe der polo-like Kinasen (PLK) gehört zu den Serin/Threonin-Kinasen und übernimmt zentrale Rollen im Zellzyklus. Zur Familie der PLK im Menschen zählen PLK1, PLK2, PLK3, PLK4 und PLK5. Innerhalb der PLK-Proteine ist die Bedeutung von PLK1 bisher am besten charakterisiert. Es übernimmt wichtige Funktionen während der Zellteilung (Archambault et al., 2015). So wurde gezeigt, dass ohne intaktes PLK1 keine adäquate Zentrosomenreifung stattfinden kann (Lane et al., 1996). Zudem ist funktionelles PLK1 für die Fragmentierung des Golgi-Apparates (Sutterlin et al., 2001), für die Spindelfaserbildung (Golsteyn et al., 1995; Sumara et al., 2004) und für die Einleitung der Zytokinese notwendig (Brennan et al., 2007; Neef et al., 2007; Petronczki et al., 2007). Außerdem erfolgt durch PLK1 die Aktivierung des Anaphase Promoting Complex (APC), was den Übergang von der Meta- in die Anaphase induziert (Hansen et al., 2004). PLK2 und PLK3 hingegen sind an Reparaturvorgängen von DNA-Schäden beteiligt und üben Einfluss auf Checkpoints des Zellzyklus aus (Conn et al., 2000; Xie et al., 2001b; Bahassi et al., 2002; Burns et al., 2003; Matthew et al., 2007; Archambault et al., 2015). Damit übernehmen PLK2 und PLK3 im Gegensatz zu PLK1 tumorsuppressive Funktionen (Dai et al., 2003; Eckerdt et al., 2005; Helmke et al., 2016). Zudem kann p53 von PLK3 als Reaktion auf oxidativen oder Adriamycin-induziertem Zellstress aktiviert werden (Xie et al., 2001a; Xie et al., 2001b). PLK4 ist entscheidend an der Verdopplung der Zentriolen beteiligt (Bettencourt-Dias et al., 2005; Habedanck et al., 2005; Sillibourne et al., 2010; Arquint et al., 2016) und über die Expression von *PLK5* können antiproliferative Signale an die Zelle gegeben werden (Andrysik et al., 2010; De Carcer et al., 2011b). PLK5 ist in Gehirntumoren hypermethyliert und damit

inaktiviert und seine Reaktivierung führt zur Apoptose der Tumorzellen (De Carcer et al., 2011a).

1.2.2 Veränderungen der PLK in malignen Zellen

Eine erhöhte *PLK1*-Expression wird sowohl in Zellen mit gesteigerter Proliferationsrate (Schmucker et al., 2014), etwa Zellen des intestinalen Epithels, als auch in einer Vielzahl von Tumorentitäten beobachtet. Dazu zählen kolorektale (Takahashi et al., 2003; Weichert et al., 2005a) und hepatozelluläre Karzinome (He et al., 2009), Pankreas- (Weichert et al., 2005c) Mamma- (Weichert et al., 2005b) und Lungenkarzinome (Wolf et al., 1997) sowie akute myeloische Leukämien (Renner et al., 2009). Die Überexpression von *PLK1* korreliert dabei mit einer schlechteren Prognose. Für solide Tumore konnte festgestellt werden, dass ein erhöhtes *PLK1*-Level mit einem gesteigertem Metastasierungsrisiko verbunden ist (Ahr et al., 2002; Kneisel et al., 2002). Außerdem kann eine Überexpression von *PLK1* eine Resistenz von Tumoren gegenüber Chemotherapeutika vermitteln (Jimeno et al., 2010). Zudem ist das Tumorüberleben von einer hochregulierten *PLK1*-Aktivität abhängig (Liu et al., 2006; Luo et al., 2009; Renner et al., 2009). Interessanterweise führt auch eine verminderte *PLK1*-Expression zur Entstehung von Tumoren. Durch Missense-Mutationen im *PLK1*-Gen (Simizu et al., 2000) entstehen fehlgefaltete Proteine, die zur Instabilität und Runterregulierung von *PLK1* führen (Buchner, 1999). Zentrale Mechanismen im Zellzyklus sind damit fehlreguliert, was die Entstehung von Tumoren wiederum begünstigt (Lu et al., 2008). Dass sowohl Hoch- als auch Runterregulierung von *PLK1* zur Karzinogenese führt, deutet darauf hin, dass *PLK1* eine komplexe Rolle in der Zellteilung einnimmt (Lu et al., 2009) und eine strikte Regulation für eine fehlerfreie Zellteilung notwendig ist.

1.2.3 Inhibition von PLK1

Aufgrund der wesentlichen Aufgaben im Zellzyklus und der Überexpression in verschiedenen Tumorentitäten (siehe 1.2.1 und 1.2.2) stellt *PLK1* eine vielversprechende Zielstruktur in der Tumorthherapie dar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibition von *PLK1* zum Proliferationsstopp und zur Apoptose von

Tumorzellen führen kann (Spankuch-Schmitt et al., 2002; Guan et al., 2005; Gumireddy et al., 2005; Steegmaier et al., 2007; Bu et al., 2008; Rudolph et al., 2009; Ackermann et al., 2011; De Oliveira et al., 2012; Hu et al., 2012; Lee et al., 2012). Einer der ersten PLK1-Inhibitoren auf dem Markt war BI 2536, der sich in präklinischen Studien als effektiv erwiesen hat (Steegmaier et al., 2007; Renner et al., 2009). Diese Wirkung konnte jedoch in klinischen Studien mit unterschiedlichen Tumorentitäten nicht ausreichend bestätigt werden. In einer Studie mit Patienten mit Rezidiv eines kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC) waren alle unter BI 2536 progredient (Awad et al., 2017) und auch in einer multizentrischen Studie mit verschiedenen soliden Tumoren (Tumore des Kopf-/Halsbereichs, Mammakarzinome, Ovarialkarzinome, Weichgewebssarkome und maligne Melanome) konnte kein Ansprechen detektiert werden (Schoffski et al., 2010). Die Ansprechrate in einer Phase II-Studie mit Patienten mit nicht-resektablen, exokrinen Adenokarzinomen des Pankreas war mit 2,3% (alle partielles Ansprechen) sehr gering (Mross et al., 2012) und auch in einer Studie für AML-Patienten betrug die Ansprechrate nur 9% (5 von 54 Patienten und davon zwei mit komplettem und drei mit partiellem Ansprechen) (Muller-Tidow et al., 2013). Auch für Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) mit Therapieversagen oder Rezidiv nach Chemotherapie konnte keine Verlängerung des Gesamtüberlebens beobachtet werden (Sebastian et al., 2010). Diese Ergebnisse führten dazu, dass das Augenmerk auf andere PLK1-Inhibitoren gerichtet wurde.

Volasertib ist der PLK-Inhibitor, für den die klinische Erprobung aktuell am weitesten fortgeschritten ist. Volasertib (BI 6727) ist ein selektiver, ATP-kompetitiver PLK-Inhibitor, der PLK1, PLK2 und PLK3 mit IC_{50} -Werten von 0,87 nM, 5 nM und 56 nM hemmt (Rudolph et al., 2009). Der Wirkstoff hemmt die *in vitro*-Zellproliferation von Tumorzelllinien, was in Mausmodellen mit soliden Tumoren und akuter myeloischer Leukämie (AML) bestätigt wurde (Ikezoe et al., 2009; Rudolph et al., 2015; Van den Bossche et al., 2016). Diese Ergebnisse zogen klinischen Studien nach sich (siehe 1.2.4). Weitere verfügbare PLK-Inhibitoren sind NMS-P937 (Valsasina et al., 2012), GSK461364A (Gilmartin et al., 2009) und ON01910 (Gumireddy et al., 2005).

1.2.4 Klinische Erprobung von Volasertib

Die vielversprechenden Ergebnisse aus präklinischen Untersuchungen mit Volasertib (siehe 1.2.3) führten zur Initiierung von klinischen Studien. So zeigten zwei unabhängige Phase I-Studien mit Volasertib in fortgeschrittenen soliden Tumoren ein gutes pharmakokinetisches Profil mit kontrollierbaren Nebenwirkungen und Hinweisen für eine vielversprechende antitumorale Effektivität (Schoffski et al., 2012; Lin et al., 2014). Zum selben Ergebnis kam eine Studie mit Ovarialkarzinomen in Phase II (Pujade-Lauraine et al., 2016). In einer Phase II-Studie mit lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Urothelkarzinomen konnte im Gegensatz dazu keine überzeugende Effektivität von Volasertib nachgewiesen werden (14% der Patienten mit partiellem Ansprechen, 29% mit stabiler Erkrankung und 60% mit Progress innerhalb von sechs Wochen) (Stadler et al., 2014). Auch für NSCLC konnte im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Permetrexed keine Effektivitätssteigerung durch die Kombinationstherapie mit Volasertib demonstriert werden (Ellis et al., 2015).

Im Bereich der hämatologischen Neoplasien ist Volasertib insbesondere für Patienten mit AML in klinischer Erprobung. Für therapienaive Patienten ≥ 65 Jahren mit AML, die nicht für eine Hochdosis-Induktionstherapie in Frage kommen, wurde eine randomisierte, Doppelblindstudie mit Volasertib in Phase III durchgeführt (POLO-AML-2 Studie) (Boehringer Ingelheim, 2016). In der Experimentalgruppe wurde Volasertib mit niedrigdosiertem Cytarabin (LDAC) und in der Kontrollgruppe Placebo mit LDAC eingesetzt. Im Experimentalarm zeigte sich eine höhere Rate an Therapieansprechen mit guter antileukämischer Wirkung (Volasertib + LDAC 25,2% vs. Placebo + LDAC 16,8%). Der primäre Endpunkt der Studie wurde aber nicht erreicht, da in der Experimentalgruppe mit Volasertib + LDAC im Vergleich zu Placebo + LDAC mehr schwerwiegende unerwünschte Ereignisse auftraten. So betrug die Häufigkeit von letalen Infektionskomplikationen im Experimentalarm mit Volasertib plus LDAC 16,6% und im Kontrollarm mit Placebo + LDAC 5,1% (Boehringer Ingelheim, 2016). Angesichts des guten klinischen Effekts sind zur maximalen Ausschöpfung der Wirkung weitere Untersuchungen für eine bessere Verträglichkeit mit weniger Nebenwirkungen erforderlich.

2 PROBLEMSTELLUNG

MDS gehören zu den häufigsten malignen hämatologischen Erkrankungen des älteren Menschen (Germing et al., 2013). Während für Patienten mit Niedrigrisiko-MDS supportive Therapien in der Regel ausreichend sind und sich das Überleben insbesondere bei sehr niedrigem WPSS nicht von dem der Normalbevölkerung unterscheidet (Malcovati et al., 2007), ist die Prognose für Patienten mit Hochrisiko-MDS ungünstig. Die 2-Jahresüberlebensrate beträgt lediglich 15% (Prébet et al., 2011). Für die einzige kurative Therapie der allogenen Stammzelltransplantation kommt aufgrund von Alter und Komorbiditäten nur ein Bruchteil der Patienten in Frage. Eine epigenetische Therapie mit Azacitidin konnte die Prognose im Vergleich zu konventionellen Therapien bereits deutlich verbessern und das mediane Überleben von 15 auf 24,5 Monate steigern (Fenaux et al., 2009). Jedoch zeigen nicht alle Patienten ein Therapieansprechen [40% der Patienten zeigen weder eine komplette (CR) oder partielle Remission (PR) noch hämatologische Verbesserung (HI)]. Zudem ist problematisch, dass Patienten das Therapieansprechen im Verlauf verlieren (mediane Dauer des Therapieansprechens 15 Monate) oder progredient unter Therapie sind (Silverman et al., 2002; Silverman et al., 2006). Deshalb ist der Bedarf an neuen Therapien groß. Es konnte bereits in einer Reihe solider und hämatologischer Neoplasien gezeigt werden, dass die Inhibition von PLK1 zum Proliferationsstopp und zur Apoptose von Tumorzellen führen kann (Spankuch-Schmitt et al., 2002; Guan et al., 2005; Gumireddy et al., 2005; Steegmaier et al., 2007; Bu et al., 2008; Rudolph et al., 2009; Ackermann et al., 2011; De Oliveira et al., 2012; Hu et al., 2012; Lee et al., 2012). Eine hohe Proliferationsrate ist ein attraktives Target für eine Therapie mit PLK1-Inhibitoren. Dies wirft die Frage auf, ob eine Inhibition von PLK1 auch als Therapieoption bei MDS und sAML in Betracht kommt. In der POLO-AML-2-Studie ergaben sich für Patienten mit akuter myeloischer Leukämie bei guter klinischer Effektivität ausgeprägte und zum Teil letale Nebenwirkungen durch massive Myelosuppression, was zum Abbruch der Studie führte (Boehringer Ingelheim, 2016). Deshalb ist auch zu untersuchen, welchen Effekt die Inhibition von PLK1 auf die gesunde Hämatopoese hat und welche Dosis sinnvoll ist.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte

In der unten stehenden Tabelle sind die in der Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Land)
Durchflusszytometer FACSCanto II	BD (Franklin Lakes, USA)
Analysenwaage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
CO ₂ -Inkubator REVCO Ultima	GS Laboratory Equipment (Ashville, USA)
Digitalwaage	Kern & Sohn GmbH (Tübingen, Deutschland)
Durchflusszytometer FACSCanto II	BD (Franklin Lakes, USA)
Fluoreszenzmikroskop BIOREVO BZ-9000	Keyence (Neu-Isenburg, Deutschland)
Inkubationsschüttler MaxQ 6000	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss (Jena, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Reichert (New York, USA)
Magnetisches Zelltrennungssystem MACS, CD34 MicroBead Kit human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Sterile Werkbank	Holten (Gydewang, Dänemark)
Varioklav Dampfsterilisator	H&P Labortechnik (Oberschleißheim, Deutschland)
Vortexschüttler	Scientific Industries (New York, USA)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Zentrifuge Multifuge 3s	Haereus (Hanau, Deutschland)

3.1.2 Chemikalien und biogene Substanzen

In der unten stehenden Tabelle sind die in der Arbeit verwendeten Chemikalien und biogene Substanzen aufgeführt.

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und biogene Substanzen

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Land)
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen (Hallbergmoos, Deutschland)
BSA Fraktion V	BioLabs (Ipswich, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (San Louis, USA)
HEPES	Sigma-Aldrich (San Louis, USA)
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich (San Louis, USA)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Paraformaldehyd 4%	Sigma-Aldrich (San Louis, USA)
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	Gibco (Grand Island, USA)

3.1.3 Standardlösungen und Puffer

In der unten stehenden Tabelle sind die in der Arbeit verwendeten Standardlösungen und Puffer aufgeführt.

Tabelle 8: Verwendete Standardlösungen und Puffer

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Land)
Annexin-V-Binding Puffer (10x)	0,1 M HEPES/NaOH, pH 7,4 1,4 M NaCl 0,9% 25 mM CaCl ₂
Biocoll Separation Solution	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
FACS-Puffer	1 x PBS 3% FCS
Fetal bovine serum (FCS)	Perbio Science (Bonn, Deutschland)
MACS-Puffer	1 x PBS 0,5% BSA 2 mM EDTA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Permeabilitäts-/Waschpuffer	BD (Franklin Lakes, USA)
Red Blood Cell Lysis Buffer	Intron Biotechnology (Sangdaewon-dong, Südkorea)
Trypanblau	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

3.1.4 Zellkulturmedien und Medienzusätze

In der unten stehenden Tabelle sind die in der Arbeit verwendeten Zellkulturmedien und Medienzusätze aufgeführt.

Tabelle 9: Verwendete Zellkulturmedien und Medienzusätze

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Land)
MethoCult H4435 enriched	Stemcell Technologies (Vancouver, Kanada)
Serumfreies Medium (SFM)	IMDM GlutaMAX™ (Gibco, Grand Island, USA) 20% BIT 9500 (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada) 1000 ng/ml trägerfreier Stem-Cell Faktor (Biolegend, San Diego, USA) 100 ng/ml Flt-3 Ligand (R&D Systems, Minneapolis, USA) 5 ng/ml Interleukin-6 (R&D Systems, Minneapolis, USA) 10 ng/ml Interleukin-3 (R&D Systems, Minneapolis, USA) 10 ng/ml Thrombopoetin (R&D Systems, Minneapolis, USA) 10 µM β-Mercaptoethanol (Gibco, Grand Island, USA) 4 µg/ml LDL (Sigma-Aldrich, San Louis, USA)
RPMI 1640	5 Vol-% FCS 1 Vol-% Glutamin 1 Vol-% Penicillin/Streptomycin in RPMI 1640 (Fisher Scientific, Waltham, USA)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco (Grand Island, USA)

3.1.5 Antikörper, Inhibitoren und Kits

In der unten stehenden Tabelle sind die in der Arbeit verwendeten Antikörper, Inhibitoren und Kits aufgeführt.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper, Inhibitoren und Kits

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Land)
7-AAD	eBioscience (San Diego, USA)
Annexin V, FITC	eBioscience (San Diego, USA)
CD34 eFluor® 450, Klon 4H111, Pacific Blue	eBioscience (San Diego, USA)
CD34 MicroBeads Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
CD34, Klon 581, PC5	Beckman Coulter (Brea, USA)
CD45, Klon 2D1, APC	eBioscience (San Diego, USA)
Fc-Block CD16/CD32	eBioscience (San Diego, USA)
Fixable Viability Dye eFluor® 506, AmCyan	eBioscience (San Diego, USA)
GSK461364A	Sigma-Aldrich (San Louis, USA)
MCL-1, Klon 19C4, Alexa Fluor® 647	Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research (Melbourne, Australien)
Volasertib (BI 6727)	Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Deutschland)

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

In der unten stehenden Tabelle sind die in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Land)
Einmalspritzen (2 ml)	Braun (Tuttlingen, Deutschland)
Einmalkanüle (ø 0,90 x 40 mm)	Braun (Tuttlingen, Deutschland)
FACS-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Falcon (15 ml, 50 ml) Röhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Falcon Zellsieb (70 µM, 100 µM)	Falcon (Tewksbury, USA)
Pipettenspitzen (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettenspitzen ungestopft (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettenspitzen gestopft (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zellkulturplatten (6-Loch, 12-Loch, 24-Loch, 96-Loch)	Falcon (Tewksbury, USA)
Zellkulturschalen (33 mm, 10 cm)	TPP (Trasadingen, Deutschland)

3.1.7 Werkzeug

In der unten stehenden Tabelle sind die in der Arbeit verwendeten Werkzeuge aufgeführt.

Tabelle 12: Verwendetes Werkzeug

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Land)
Knochensplitterzange	Braun (Tuttlingen, Deutschland)
Pinzette (chirurgisch)	Braun (Tuttlingen, Deutschland)

3.1.8 Software

In der unten stehenden Tabelle ist die in der Arbeit verwendete Software aufgeführt.

Tabelle 13: Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Land)
Adobe Illustrator CS4	Adobe Systems Inc. (San José, USA)
GraphPad Prism V.6.0g	GraphPad Software Inc. (La Jolla, USA)
Microsoft Excel V.14.5.2	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
FlowJo V.10.0.8	Tree Star Inc. (Ashland, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung von Probenmaterial

Primäre mononukleäre Zellen wurden aus heparinisierten Knochenmarksaspiraten von Patienten mit MDS oder sAML gewonnen. Die Probenentnahme erfolgte gemäß klinischer Indikation zur initialen Diagnostik oder zur Evaluation des Therapieerfolgs unabhängig vom Therapieregime der Patienten. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Katharina Götze (III. Medizinische Klinik für Hämatologie und internistische Onkologie, Klinikum rechts der Isar der TU München), Dr. med. Catharina Müller-Thomas (III. Medizinische Klinik für Hämatologie und internistische Onkologie, Klinikum rechts der Isar der TU München), Dr. med. Burkhard Schmidt (Onkologie Pasing, München), apl. Prof. Dr. med. Christoph Clemm (Tumorthesapiezentrum, Klinikum rechts der Isar der TU München), Prof. Dr. med. Dr. phil. Torsten Haferlach (Münchner Leukämielabor), Dr. med. Frauke Bellos (Münchner Leukämielabor) und Dr. med. Gerhard Puchtler (II. Medizinische Klinik für Hämatologie und internistische Onkologie, Klinikum Rosenheim) zur Verfügung gestellt. Ein Ethikvotum wurde bei der Ethikkommission der Technischen Universität München vorab eingeholt (62/16S). Die Patienten erklärten gemäß der Deklaration von Helsinki schriftlich ihr Einverständnis zur Aufnahme in die Studie.

3.2.2 Gewinnung von Kontrollmaterial

Um das Patientenmaterial bestmöglich mit dem Kontrollmaterial vergleichen zu können, wurden gesunde mononukleäre Knochenmarkszellen einer alterskorrelierten Kohorte als Kontrollmaterial verwendet. Diese wurden aus humanen Hüftköpfen gewonnen, die im Rahmen einer Implantation einer Hüft-Totalendoprothese entnommen und freundlicherweise von Dr. Johannes Schauwecker (Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Klinikum rechts der Isar, München) zur Verfügung gestellt wurden. Ein Ethikvotum wurde bei der Ethikkommission der Technischen Universität München vorab eingeholt (62/16S). Die Patienten erklärten schriftlich gemäß der Deklaration von Helsinki ihr Einverständnis zur Aufnahme in die Studie. Insgesamt wurden 28 Kontrollproben untersucht. Die frisch explantierten Hüftköpfe

wurden steril aus dem orthopädischen Operationssaal abgeholt und mittels Knochensplitterzange in 1 - 3 mm große Knochenchips zerkleinert. Danach erfolgte zum Herauswaschen des Knochenmarks eine großzügige Spülung mit PBS. Die sich ansammelnde Fettschicht wurde abgenommen und die Spüllösung durch einen 70 µm-Filter gegeben. Alle hier aufgeführten Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß den Knochenmarksaspirationen (siehe 3.2.3).

3.2.3 Aufreinigung von primärem Material

Zur Aufreinigung der mononukleären Zellen aus den Knochenmarksaspirationen wurde eine Lösung mit PBS hergestellt, die vorsichtig auf Ficoll geschichtet (Verhältnis Knochenmark-PBS-Lösung : Ficoll = 1 : 1) und 15 min bei 800 g und 20°C zentrifugiert wurde. Die Spüllösungen der gesunden Kontrollproben wurden direkt auf Ficoll gegeben. Nach der Zentrifugation wurde der Buffy-coat abgenommen, nochmals zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes die Erythrozytenlyse durchgeführt. Hierbei wurde das Pellet für fünf Minuten mit RBC-Lysepuffer inkubiert und danach mit PBS abgestoppt. Lebende Zellen wurden durch Anfärben mit Trypanblau identifiziert, in einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert und anschließend in einer Dichte von 5×10^5 lebende Zellen/ml Medium in eine 24-Loch-Platte überführt. Die Zellkultivierung erfolgte in serumfreiem Medium (IMDM GlutaMAX™, 20% BIT 9500, 1000 ng/ml trägerfreier Stem-Cell Faktor, 100 ng/ml Flt-3 Ligand, 5 ng/ml Interleukin-6, 10 ng/ml Interleukin-3, 10 ng/ml Thrombopoetin, 10 µM β-Mercaptoethanol, 4 µg/ml LDL) und - falls nicht anders angegeben - für 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Alle hier aufgeführten Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.2.4 Anreicherung von CD34⁺ mononukleären Knochenmarkszellen

Waren nach den Aufreinigungsschritten mehr als 1×10^8 viable Zellen vorhanden, wurde eine Anreicherung der CD34⁺ mononukleären Knochenmarkszellen durchgeführt. Dies erfolgte mit Hilfe des magnetischen Zelltrennungssystems (MACS CD34 MicroBead Kit) nach Angaben des Herstellers. Die Zellkultivierung erfolgte

auch hier für 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Alle hier aufgeführten Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.2.5 Inkubation mit dem PLK1-Inhibitor

In der Zellkultur wurde die Behandlung mit den PLK1-Inhibitoren Volasertib (BI 6727) oder GSK461364A vorgenommen, die in DMSO gelöst waren und in Konzentrationen von 1 nM bis 1 µM eingesetzt wurden. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO in den entsprechenden Verdünnungen (0,1% bis 0,0001%).

3.2.6 Viabilitätsmessung mittels Durchflusszytometrie

Die Viabilitätsmessung erfolgte durch die Detektion der Oberflächenmoleküle Annexin V und 7-AAD. Phosphatidylserin befindet sich bei lebenden Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Im Rahmen von frühen Apoptose-Prozessen wird Phosphatidylserin auf die Zelloberfläche transloziert, sodass es durch Annexin V detektiert werden kann. 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) ist ein DNA-bindender Farbstoff, der ausschließlich spät-apoptotische und tote Zellen markiert, da für eine Bindung eine defekte Zellmembran erforderlich ist. Durch die Kombination von Annexin V und 7-AAD kann zwischen lebenden (Annexin V und 7-AAD negativ), früh-apoptotischen (Annexin V positiv und 7-AAD negativ) und spät-apoptotischen (Annexin V und 7-AAD positiv) Zellen unterschieden werden. Die Zellen wurden nach Inhibitorbehandlung einmalig mit PBS gewaschen und anschließend mit Fc-Block (1:200), Pacific-Blue-konjugiertem CD34-Antikörper (1:50) und APC-konjugiertem CD45-Antikörper (1:50) für 20 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden sie mit Annexin-V-Binding-Buffer gewaschen und mit FITC-konjugiertem Annexin-V-GFP (1:20) für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Anschließend wurde 7-AAD (1:20) zugegeben und die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt.

3.2.7 Koloniebildungsassay

Nach 72 Stunden Behandlung mit dem Inhibitor bzw. der Lösungsmittelkontrolle wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und ausgezählt. Davon wurden für

Duplikate 2×10^4 Zellen abgenommen und unter Zugabe von 35 μ l Penicillin/Streptomycin und 350 μ l IMDM, GlutaMAX™ nach Herstellerangaben in 2,2 ml Inhibitor-freie Methylcellulose (MethoCult H4435 enriched) gegeben. Die Ausplattierung erfolgte in zwei 33-mm-Platten (Endvolumen jeweils ca. 1,1 ml). Zusammen mit einer weiteren 33-mm-Platte, die mit Aqua dest. aufgefüllt wurde, um ein Austrocknen zu verhindern, wurden die Platten in eine Petrischale gestellt. Die Inkubation erfolgte für zehn bis 14 Tage bei 37°C und 5% CO₂, bevor die Kolonien am Lichtmikroskop ausgezählt und morphologisch charakterisiert wurden. Zellhaufen wurden als Kolonien definiert, wenn sie mindestens 20 Zellen umfassten. Es wurden folgende Kolonie-bildende Einheiten unterschieden: Colony-forming unit - Granulozyten, Makrophagen (CFU-GM), Colony-forming unit - Granulozyten, Erythrozyten, Makrophagen, Megakaryozyten (CFU-GEMM) und Burst-forming unit - Erythrozyten (BFU-E). Fotografien wurden am Fluoreszenzmikroskop BIOREVO BZ-900 erstellt.

3.2.8 Proliferationsmessung *in vitro* mittels CFSE

Die Proliferationsmessung wurde mit dem zellwandpermeablen, fluoreszierenden Farbstoff Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) vorgenommen, der intrazelluläre Strukturen bindet und während der Zellteilung an alle Tochterzellen weitergegeben wird. 5×10^5 mononukleäre Zellen/ml wurden in vorgewärmtes RPMI-Medium aufgenommen und CFSE wurde zugegeben (Konzentration: 2,5 μ M). Darauf folgte eine Inkubationszeit von 10 min bei 37°C, wobei das Falcon dreimal invertiert wurde, um die Bindungsfähigkeit zu steigern. Danach wurde die Färbung mit 10 ml 4°C-kaltem RPMI-Medium mit Zusätzen (5 Vol-% FCS, 1 Vol-% Glutamin, 1 Vol-% Penicillin/Streptomycin) gestoppt. Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und nochmal mit 10 ml 4°C-kaltem RPMI-Medium mit Zusätzen (5 Vol-% FCS, 1 Vol-% Glutamin, 1 Vol-% Penicillin/Streptomycin) gewaschen. Für die Inkubation in der 24-Loch-Platte wurden die Zellen in Serum-freies Medium (IMDM GlutaMAX™, 20% BIT 9500, 1000 ng/ml trägerfreier Stem-Cell Faktor, 100 ng/ml Flt-3 Ligand, 5 ng/ml Interleukin-6, 10 ng/ml Interleukin-3, 10 ng/ml Thrombopoetin, 10 μ M β -Mercaptoethanol, 4 μ g/ml LDL) gegeben und entweder mit der

Lösungsmittelkontrolle DMSO (Verdünnung 1:1000) oder mit Volasertib (1 μ M) behandelt. Die Analyse wurde nach 72 Stunden mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

3.2.9 Mutationsanalysen

Der Mutationsstatus der Patienten mit MDS und sAML wurde im Rahmen der Routinediagnostik durch das MML (Münchner Leukämie Labor) mittels Sanger Sequenzierung oder Next Generation Sequenzierung bestimmt. Die Patienten wurden auf Mutationen in den Genen *RUNX1*, *ASXL*, *TP53* und *EZH2* untersucht.

3.2.10 Genexpressionsanalysen

Die Genexpression wurde mittels Affymetrix HG U133 Plus 2.0 (Santa Clara, CA, USA) analysiert. Die Microarray-Daten wurden bereits veröffentlicht (Mills et al., 2009; Pellagatti et al., 2010) und unter Anleitung von Ulrike Höckendorf aus dem Gene Expression Omnibus (GEO) als Rohdaten abgerufen (GEO: GSE15061, GSE19429).

Die Daten von Mills et al., 2009 (GEO: GSE15061) stammen von Gesamtknochenmarksproben von 164 Patienten mit MDS und von 69 nicht-leukämischen Kontrollprobanden. In die Gruppe der nicht-leukämischen Kontrollprobanden wurden neben gesunden Probanden auch Patienten mit Eisenmangelanämie, hämolytischer und megaloblastärer Anämie und idiopathischer immunthrombozytopenischer Purpura (ITP) aufgenommen. Die Daten von Pellagatti et al., 2010 (GEO: GSE19429) stammen von CD34⁺-aufgereinigten Knochenmarksproben von 183 Patienten mit MDS und von 17 gesunden Kontrollprobanden.

Für die Annotation der Datensets wurden Chip Definition Files (CDF) verwendet, die auf GeneAnnot (Version 2.0) basierten und mit GeneCards (Version 3.04) synchronisiert wurden. Diese CDF verringern die Gesamtanzahl der Sondensätze auf einen Sondensatz pro Gen und erhöhen potentiell die Spezifität der Analysen durch Eliminieren von kreuzhybridisierenden Sonden (Sonden sind durch Sequenzspezifität eingeschränkt). Eine Normalisierung der Daten wurde, wie bereits

in der Literatur beschrieben (Irizarry et al., 2003), mittels Robust Multichip Average (RMA) durchgeführt.

3.2.11 Proliferationsmessung mittels Ki-67

Als Proliferationsmarker wurde das Protein Ki-67 benutzt, das ausschließlich von proliferierenden Zellen exprimiert wird (Scholzen et al., 2000). Es wurde die Proliferationskapazität in Paraffin-eingebetteten Knochenmarksstanzen von MDS- und sAML-Patienten sowie gesunden Kontrollen durch Anfärben von Ki-67 untersucht. Es handelte sich um eine retrospektive Analyse von asserviertem Gewebe. Die Knochenmarksstanzen der MDS- und sAML-Patienten wurden zwischen 2000 und 2018 am Institut für Pathologie der Technischen Universität München gesammelt. Für die Kontrollen wurden gesunde humane Hüftköpfe biopsiert (für die Gewinnung der Hüftköpfe siehe 3.2.2). Die Knochenmarksstanzen wurden in 4% Paraformaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und mit EDTA dekalzifiziert. Die Färbungen wurden von Frau PD Dr. Slotta-Huspenina vom Institut für Pathologie der Technischen Universität München durchgeführt. Zusammen mit ihr erfolgte die Auswertung der Ki-67 positiven Knochenmarkszellen.

3.2.12 Quantifizierung des MCL-1-Proteinlevels mittels Durchflusszytometrie

Nach Aufreinigung der mononukleären Zellen (wie in 3.2.3 beschrieben) erfolgte die Inkubation mit dem fixierbarem Viabilitätsfarbstoff (eFluor[®] 506) in einer Konzentration von 1:1000 bei 4° C für 30 min. Danach wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen und mit dem PC5-konjugierten CD34-Antikörper (Klon 581) in einer Konzentration von 1:10 angefärbt (Inkubation für 20 min bei 20° C in Dunkelheit). Nachdem zweimal mit FACS-Puffer gewaschen wurde, um Überstände zu entfernen, wurde die Zellfixierung in 2%-Paraformaldehydlösung (Inkubation für 15 min bei 20° C in Dunkelheit) vorgenommen. Vor der intrazellulären Anfärbung wurde mehrmals mit dem Permeabilisierungs- und Waschpuffer gewaschen. Nach der Permeabilisierung wurde die MCL-1-Färbung mit dem Alexa Fluor[®] 647-konjugierten Antikörper in einer Konzentration von 1:500 durchgeführt (Inkubation für 60 min bei 4 °C). Unspezifische Hintergrundfärbungen wurden durch eine Isotyp-

Kontrolle detektiert und bei der Berechnung der Mean fluorescence intensity (MFI) berücksichtigt. Die Quantifizierung des MCL-1-Proteinlevels in den lebenden Zellen erfolgte danach mittels Durchflusszytometrie.

3.2.13 Statistische Analyse

Für Vergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, auf die paarweise post-hoc-Vergleiche der Mittelwerte mithilfe von t-Tests folgten. Für die Analyse von Unterschieden zwischen Proben- und Kontrollprobenmaterial wurde der zweiseitige t-Test für unabhängige Stichproben und für die Analyse von Dosistitrationen der zweiseitige t-Test für abhängige Stichproben angewandt. Die p-Werte wurden nicht für multiple Vergleiche angepasst. Das Signifikanzniveau betrug 0,05. Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism (V.6.0g) durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Zelltodanalysen wurden in einer Kohorte von 75 Patienten durchgeführt (Tabelle 7). Das Patientenkollektiv setzte sich aus Patienten mit MDS (n = 60) und sAML nach MDS (n = 15) zusammen. Eine sAML nach MDS wurde durch einen Blastenanteil im Knochenmark über 20% gemäß WHO-Klassifikation definiert (Arber et al., 2016). Für diese Patienten sind die Risikostratifizierungen nach WPSS, IPSS und IPSS-R nicht anwendbar (Kennzeichnung mit „n. a.“). Von den MDS-Patienten konnte einer der WHO-Klassifikation MDS SLD zugeordnet werden. Für 27 Patienten wurde die Diagnose MDS MLD gestellt, von denen zwei ein therapieassoziiertes MDS hatten (tMDS). Drei Patienten hatten ein MDS RS-SLD und vier ein MDS RS-MLD. Die Subpopulation von MDS EB-1 wurde von 15 (davon einer mit tMDS) und die von MDS EB-2 von elf Patienten gebildet. Detaillierte Informationen bezüglich der klinischen Annotation (WHO-Klassifikation, Risikostratifizierung mittels WPSS, IPSS, IPSS-R und Zytogenetik, Karyotyp) ist der Tabelle 7 zu entnehmen. Von den 75 untersuchten Patienten waren 50 männlich und 25 weiblich. Das mediane Alter der untersuchten Population betrug 73 Jahre (von 41 bis 86 Jahre). Die Altersverteilung der verschiedenen Subgruppen ist in Tabelle 8 dargestellt.

Als Kontrollmaterial dienten mononukleäre Knochenmarkszellen von 28 hämatologisch gesunden und alterskorrelierten Patienten (Tabelle 8), von denen 20 männlich und acht weiblich waren. Das mediane Alter betrug 64 Jahre. Das Knochenmark wurde aus humanen Hüftköpfen isoliert, die im Rahmen einer Operation mit Einbau einer Hüfttotalendoprothese explantiert wurden und sonst verworfen worden wären. Als Ausschlusskriterien für die Aufnahme in das Kontrollkollektiv galten bekannte onkologische Nebendiagnosen (z.B. Prostatakarzinom) oder Auffälligkeiten im aktuellen Blutbild (z.B. Anämie oder Leukozytose). Sowohl Proben- als auch Kontrollmaterial wurde stets unmittelbar nach Entnahme verarbeitet, um optimale Versuchsbedingungen zu schaffen und eine möglichst hohe Viabilität der Zellen zu Versuchsbeginn zu gewährleisten.

Tabelle 14: Klinische Annotation des Patientenkollektivs

Alter, Geschlecht (m = männlich, w = weiblich), WHO-Kategorie, Karyotyp, WPSS, IPSS, IPSS-R und zytogenetischer Risikoscore nach Schanz (Schanz et al., 2012) (int. = intermediär). SAML wurden durch die WHO-Klassifikation definiert (Blastenanteil > 20%) (Arber et al., 2016); für diese Patienten wurde kein Risikoscore berechnet (gekennzeichnet durch n. a. = nicht anwendbar).

Nr	Alter	Geschlecht	WHO	Karyotyp	WPSS	IPSS	IPSS-R	Zytogenetisches Risiko
1	83	m	SLD	46,XY	sehr niedrig	niedrig	niedrig	gut
2	42	w	MLD	46,XX	int.	niedrig	int.	gut
3	71	m	MLD	46,XY	niedrig	niedrig	sehr niedrig	gut
4	66	m	MLD	46,XY	int.	niedrig	niedrig	gut
5	80	m	MLD	45,X,-Y	niedrig	int.-1	int.	sehr gut
6	74	m	MLD	46,XY	int.	int.-1	niedrig	gut
7	69	m	MLD	46,XY,del(5q)	niedrig	niedrig	niedrig	gut
8	84	m	MLD	46,XY	int.	int.-1	niedrig	gut
9	80	w	MLD	46,XX,del(5q)	niedrig	int.-1	int.	gut
10	43	w	MLD	46,XX	niedrig	niedrig	sehr niedrig	gut
11	83	m	MLD	46,XY,del(9)(p21q33)	int.	int.-1	niedrig	int.
12	81	m	MLD	46,XY	int.	int.-1	int.	gut
13	86	w	MLD	46,XX	niedrig	niedrig	niedrig	gut
14	68	m	MLD	46,XY	int.	int.-1	int.	gut
15	66	m	MLD	47,XY,del(20q)	int.	int.-1	niedrig	gut
16	74	w	MLD	46,XX	niedrig	niedrig	sehr niedrig	gut
17	65	w	MLD	46,XX	int.	int.-1	hoch	gut
18	86	w	MLD	46,XX del(5q);47, XX,+21	niedrig	niedrig	int.	gut
19	82	m	MLD	46,XY	niedrig	int.-1	niedrig	gut
20	74	m	MLD	46,XY	int.	int.-1	int.	gut
21	75	w	MLD	46,XX, del(5)(q13q34)	int.	niedrig	niedrig	gut
22	74	m	MLD	46,XY	niedrig	int.-1	niedrig	gut
23	74	w	MLD (tMDS)	46,XX,del(5)(q22q33), r(7)(p11q11), del(12)(p11p13)	hoch	int.-2	hoch	schlecht
24	53	w	MLD (tMDS)	47,XX,+19	int.	niedrig	int.	int.
25	77	m	MLD	45,X,-Y	niedrig	int.-1	niedrig	sehr gut
26	68	m	MLD	46,XY	niedrig	int.-1	sehr niedrig	gut
27	67	m	MLD	46,XY	niedrig	int.-1	sehr niedrig	gut
28	76	w	RS-SLD	46,XX	niedrig	niedrig	niedrig	gut
29	73	w	RS-SLD	46,XX	niedrig	niedrig	niedrig	gut
30	78	m	RS-SLD	47,XY +8	niedrig	int.-1	int.	int.
31	77	m	RS-MLD	46,XY	int.	niedrig	niedrig	gut
32	86	m	RS-MLD	46,XY,der(18)t(9;18)	hoch	int.-2	hoch	int.
33	77	w	RS-MLD	46,XX	int.	int.-1	int.	gut
34	74	w	RS-MLD	46,XX	int.	int.-1	int.	gut
35	73	m	EB-1	46,XY; 47,XY +8	sehr hoch	int.-2	sehr hoch	int.
35	69	m	EB-1	45,XY,-7	int.	int.-2	hoch	schlecht
37	70	m	EB-1	47,XY,+8	hoch	int.-2	hoch	int.
38	67	m	EB-1	47,XY,+8	hoch	high	hoch	int.
39	66	m	EB-1	47,XY,del(20q)	hoch	int.-1	int.	gut
40	80	m	EB-1	46,XY	int.	int.-1	hoch	gut
41	75	m	EB-1	46,XY	high	int.-1	hoch	gut
42	79	w	EB-1	46,XX,del(5q),del(3)(q21),+8	hoch	int.-2	hoch	schlecht
43	66	m	EB-1	46, XY	hoch	int.-1	hoch	gut
44	74	w	EB-1	46, XX	int.	int.-1	int.	gut

45	60	m	EB-1	complex (3 aberrations)	hoch	int.-2	hoch	schlecht
46	63	m	EB-1 (tMDS)	46,XY, t(4;19)	hoch	hoch	sehr hoch	int.
47	71	m	EB-1	komplex (>3 Aberrationen)	sehr hoch	int.-2	sehr hoch	sehr schlecht
48	71	m	EB-1	komplex (>3 Aberrationen)	sehr hoch	int.-2	sehr hoch	sehr schlecht
49	72	m	EB-1	komplex (>3 Aberrationen)	sehr hoch	int.-2	sehr hoch	sehr schlecht
50	84	w	EB-2	komplex (>3 Aberrationen)	sehr hoch	hoch	sehr hoch	sehr schlecht
51	78	m	EB-2	46,XY	hoch	hoch	hoch	gut
52	74	m	EB-2	45,XY,del(11q),-Y,del(5q)	sehr hoch	hoch	hoch	schlecht
53	73	w	EB-2	komplex (>3 Aberrationen)	sehr hoch	int.-2	sehr hoch	sehr schlecht
54	45	m	EB-2	komplex (>3 Aberrationen)	sehr hoch	hoch	sehr hoch	sehr schlecht
55	41	m	EB-2	47,XY,+8	sehr hoch	hoch	sehr hoch	int.
56	69	m	EB-2	46,XY	hoch	int.-2	hoch	gut
57	62	m	EB-2	46/47, XY, inv(11),+14,+8,	sehr hoch	hoch	sehr hoch	schlecht
58	62	m	EB-2	46/47, XY, inv(11),+14,+8,	sehr hoch	hoch	sehr hoch	schlecht
59	71	m	EB-2	46, XY	hoch	int.-2	int.	gut
60	75	m	EB-2	45,X,-Y,del(11)(q14q25)	hoch	hoch	hoch	int.
61	81	m	sAML	46,XY,t(2;8)(p10;q10)	n.a.	n.a.	n.a.	int.
62	65	w	sAML	komplex (>3 Aberrationen)	n.a.	n.a.	n.a.	sehr schlecht
63	81	m	sAML	46,XY,t(2;8)(p10;q10)	n.a.	n.a.	n.a.	int.
64	85	w	sAML	komplex (>3 Aberrationen)	n.a.	n.a.	n.a.	sehr schlecht
65	77	m	sAML	46,XY	n.a.	n.a.	n.a.	gut
66	81	w	sAML	46,XX	n.a.	n.a.	n.a.	gut
67	76	m	sAML	komplex (>3 Aberrationen)	n.a.	n.a.	n.a.	sehr schlecht
68	71	m	sAML	46,XY,+1,der(1;22)(q10;q10)	n.a.	n.a.	n.a.	int.
69	64	w	sAML	46,XX,inv(12)(p13q21)	n.a.	n.a.	n.a.	int.
70	70	w	sAML	46,XX	n.a.	n.a.	n.a.	gut
71	70	m	sAML	46,XY	n.a.	n.a.	n.a.	gut
72	66	m	sAML	46,XY,del(7)(q21q36), del(20)(q11q13)	n.a.	n.a.	n.a.	schlecht
73	46	m	sAML	komplex (>3 Aberrationen)	n.a.	n.a.	n.a.	sehr schlecht
74	75	w	sAML	46,XX	n.a.	n.a.	n.a.	gut
75	58	w	sAML	46,XX,del(5q),del(16q)	n.a.	n.a.	n.a.	gut

Tabelle 15: Altersverteilung von Patienten- und Kontrollkollektiv

Anzahl der analysierten Proben pro Kategorie mit Altersverteilung sowie Anzahl an männlichen und weiblichen Probanden.

Kategorie	Anzahl	Medianes Alter	Männlich	Weiblich
alle	103	71	70	33
gesund	28	64	20	8
MDS/sAML	75	73	50	25
Zytopenetisches Risiko				
sehr gut	2	79	2	0
gut	41	74	24	17
intermediär	14	72	12	2
schlecht	8	68	6	2
sehr schlecht	10	72	6	4
MDS	60	74	42	18
WPSS				
sehr niedrig	1	83	1	0
niedrig	16	75	9	7
intermediär	18	74	11	7
hoch	14	71	12	2
sehr hoch	11	71	9	2
IPSS				
niedrig	14	74	5	9
intermediär-1	23	74	18	5
intermediär-2	13	71	10	3
hoch	10	65	9	1
IPSS-R				
sehr niedrig	5	68	3	2
niedrig	15	76	11	4
intermediär	14	74	7	7
hoch	15	74	12	3
sehr hoch	11	71	9	2
sAML	15	71	8	7

4.2 Identifizierung der MDS-Stamm-/Vorläuferzelle

Die Klonalität von MDS ist definiert durch das Vorhandensein von MDS-vorläuferähnlichen Zellen und einer reifen Zellpopulation (Woll et al., 2014). Um zwischen reifen mononukleären Zellen und MDS-Vorläuferzellen zu unterscheiden, wurde in der Durchflusszytometrie die CD34⁺ Subpopulation betrachtet. Denn es ist davon auszugehen, dass die Population der CD34⁺ Zellen die malignen MDS-

Stamm-/Vorläuferzellen umfasst (Parker et al., 2000; Albitar et al., 2002; Pang et al., 2013; Jaiswal et al., 2014; Woll et al., 2014). Um einen adäquaten Therapieeffekt zu erzielen, ist es notwendig die pathologische MDS-Vorläuferzelle gezielt zu treffen. Deshalb wurde in den Versuchen zur Induktion von Zelltod ein besonderes Augenmerk auf diese Zellpopulation gerichtet.

4.3 Nachweis erhöhter *PLK1*-Expression im Knochenmark von MDS-Patienten mittels Genexpressionsanalysen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Genexpressionsdaten aus öffentlich zugänglichen Datenbanken zu *PLK* in MDS- und gesundem Knochenmark analysiert. (Abbildung 1). Die Untersuchung der Gesamtheit der mononukleären Zellen (GEO15061) (Mills et al., 2009) des Knochenmarks von MDS-Patienten zeigt, dass *PLK1* in MDS im Vergleich zum nicht-leukämischen Knochenmark statistisch signifikant höher exprimiert wird (Abbildung 1A). Für *PLK2* wurden keine Unterschiede detektiert (Abbildung 1B). Interessanterweise weist *PLK3* im gesunden Knochenmark eine gesteigerte Expression auf (Abbildung 1C). Im Datensatz der nicht-leukämischen Probanden waren neben gesunden Kontrollen auch Patienten mit Eisenmangelanämie, hämolytischer und megaloblastärer Anämie und idiopathischer immunthrombozytopenischer Purpura (ITP) aufgeführt.

Im nächsten Schritt wurden die Genexpressionsanalysen für *CD34*⁺ Knochenmarkszellen durchgeführt. In den zur Verfügung stehenden Datenbanken (GEO19420) (Pellagatti et al., 2010) waren die MDS-Proben nach WHO-Klassifikation untergliedert. Hier zeigte sich, dass *PLK1* in MDS-Frühestadien (SLD und RS-SLD) hochreguliert ist. *PLK2* war im gesunden Knochenmark höher exprimiert als im Knochenmark von MDS-Patienten. Diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 1E). *PLK3* hat auch in den *CD34*⁺ Zellen von gesundem Knochenmark ein höheres Expressionslevel. Eine statistische Signifikanz ergab sich für gesund vs. RS-SLD und gesund vs. EB-1 (Abbildung 1F). Die Kohorte der Kontrollen wurde ausschließlich von gesunden Probanden gebildet. Basierend auf diesen Ergebnissen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass

PLK1 in MDS ein vielversprechender Ansatzpunkt für eine Therapie mit PLK1-Inhibitoren ist.

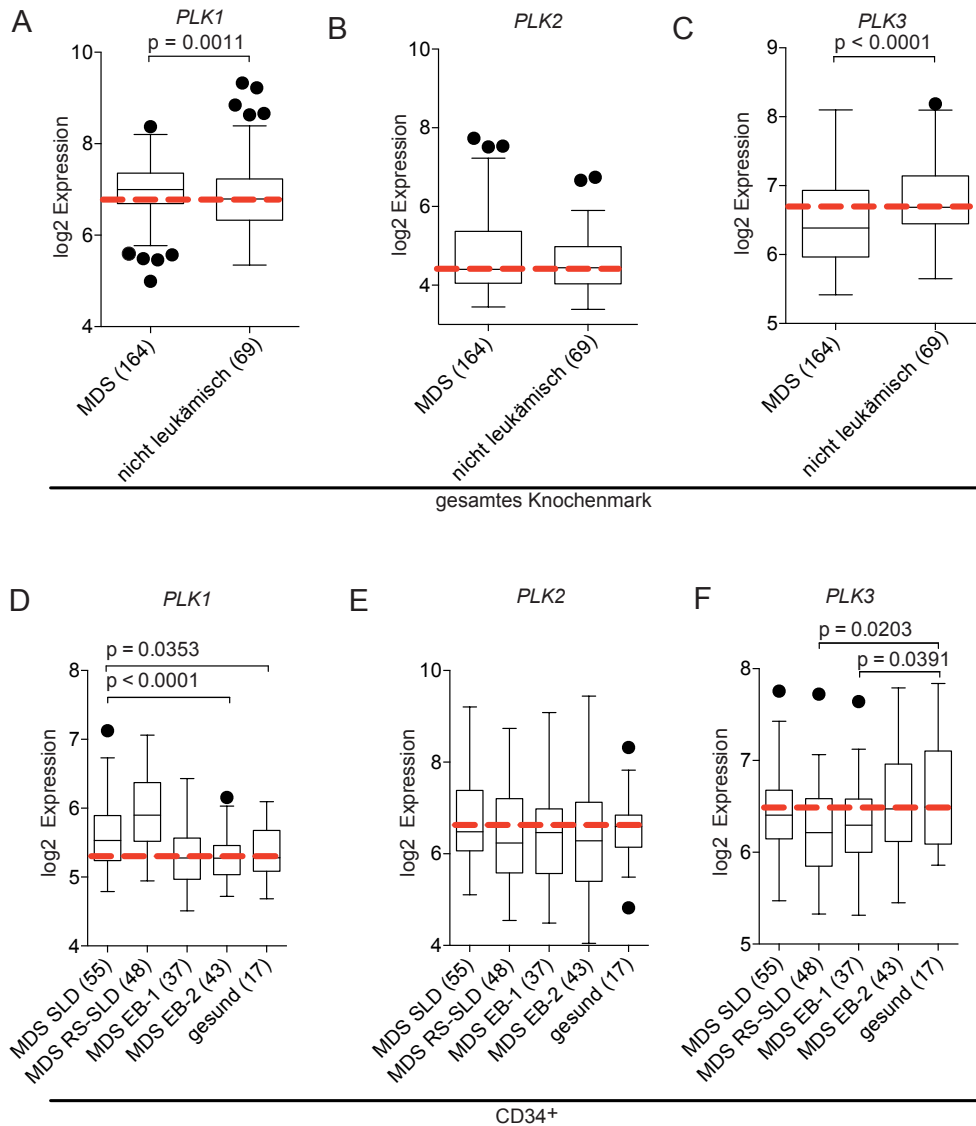


Abbildung 1: Genexpressionsanalysen der PLK-Familie in MDS und gesunden Kontrollen

(A)-(C) Genexpressionsprofile von *PLK1*, *PLK2* und *PLK3* im Knochenmark von 164 MDS-Patienten und 69 gesunden bzw. nicht leukämischen Kontrollproben (GEO: GSE15061). Die gestrichelte, rote Linie markiert das Expressionslevel im gesunden Knochenmark. (D)-(F) Genexpressionsprofile von *PLK1*, *PLK2* und *PLK3* in CD34⁺ Knochenmarkszellen von 183 MDS-Patienten gemäß WHO-Klassifikation und 17 gesunden Kontrollproben (GEO: GSE19429). Die rote gestrichelte Linie markiert das Expressionslevel im gesunden Knochenmark.

4.4 Nachweis erhaltener Proliferationskapazität im seneszenten Knochenmark

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferationskapazität im primärem gesunden Knochenmark von älteren Patienten und im Knochenmark von MDS-Patienten untersucht, um einen möglichen Einfluss der Seneszenz auf die Proliferation auszuschließen. Dazu wurde in Schnitten von in Paraffin eingebetteten Knochenmarksstanzen der Proliferationsmarker Ki-67 angefärbt. Die Proliferationskapazität wurde definiert als Anteil der Ki-67 positiven Zellen im gesamten Knochenmark.

Interessanterweise beeinflusste das Alter der Patienten die Proliferationskapazität im gesunden Knochenmark nicht. Die Proliferationsindices der älteren (Alter der Kontrollprobanden über 60 Jahren; Median der Ki-67 positiven Zellen 70%) und jüngeren Kohorte (Median der Ki-67 positiven Zellen 80%) unterschieden sich nicht. Es wurde zudem mittels unverbundenem t-Test kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen gesundem Knochenmark (Median der Ki-67 positiven Zellen 80%) und dem Knochenmark von MDS- und sAML-Patienten (Median der Ki-67 positiven Zellen 70%) festgestellt. Außerdem wurde keine Zunahme der Proliferationskapazität mit fortschreitender MDS-Erkrankung beobachtet. Stattdessen wurde für die Patienten mit MDS EB-1 eine nicht signifikante Verminderung detektiert (Median der Ki-67 positiven Zellen 45% für MDS EB-1). In der Kohorte der MDS EB-1 Patienten zeigten drei einen relativ niedrigen Proliferationsindex von 30%. Die Charakteristika von Patient Nr.1 waren: 78 Jahre alt, weiblich, Blastenexzess 8%, IPSS-r hoch, bekannte TP53-Mutation und Nachweis von einer Deletion des Chromosoms 5q. Die analysierte Biopsie wurde nach sechs Zyklen Azacitidin entnommen. Der Patient Nr. 2 war 80 Jahre alt, männlich, mit Blastenexzess von 6% und therapienaiv. Sein WPSS war sehr hoch und es wurde eine Deletion des Chromosoms 7q nachgewiesen. Der letzte Patient mit einem Proliferationsindex von 30% war eine 98-jährige therapienaive Frau mit Blastenexzess von 7 - 8%, sehr hohem IPSS-R und einer Deletion des Chromosoms 7q.

Es konnte hier gezeigt werden, dass PLK1-Inhibition ein potenzieller Angriffspunkt in allen MDS-Stadien ist. Zudem ist auch die gesunde Resthämatopoese des älteren

Menschen proliferativ. Deshalb muss man sich möglicher Nebenwirkungen einer PLK1-Inhibition in dieser Kohorte bewusst sein.

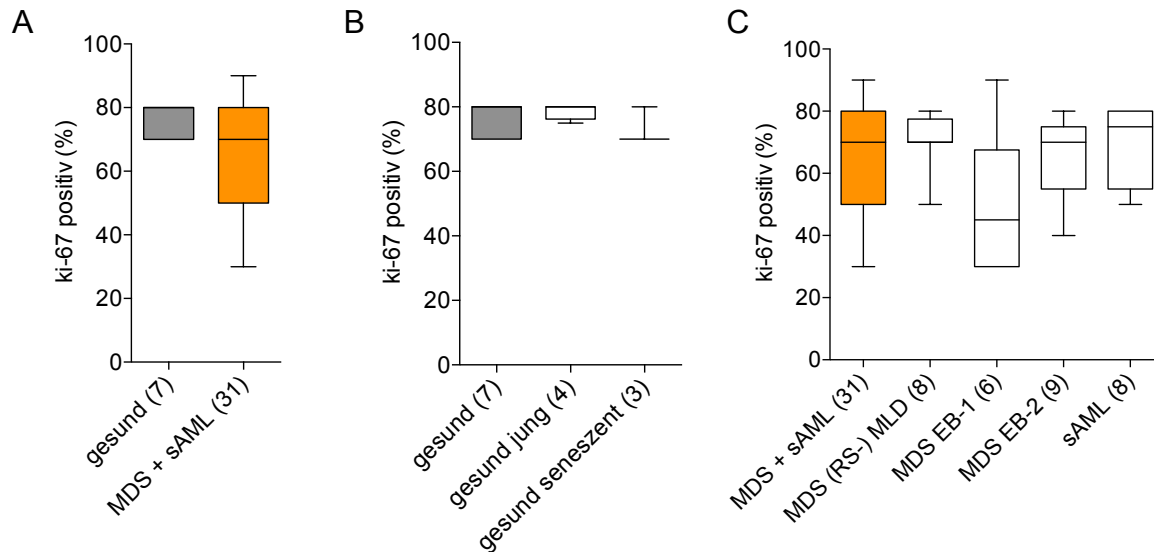


Abbildung 2: Alter und MDS-Stadium haben keinen Einfluss auf die Proliferationskapazität der Knochenmarkszellen

In Paraffin eingebettete Knochenmarksstanzen von gesunden Kontrollen und Patienten mit MDS mit Dysplasie in mehreren Zelllinien (und Ringsideroblasten) (MDS [RS-] MLD, n = 8), MDS mit Blastenexzess < 10% (EB-1, n = 6), MDS mit Blastenexzess > 10% (EB-2, n = 9) und sekundärer akuter myeloischer Leukämie (sAML, n = 8) wurden für Ki-67 als Proliferationsmarker angefärbt. Die gesunden Kontrollen (n = 7) wurden bei einem Alter > 60 Jahre als seneszent klassifiziert. In der Abbildung ist der Mittelwert mit der Standardabweichung (SD) der Ki-67 positiven Zellen als Boxplot gezeigt. (A) Der unverbundene t-Test ergab einen p-Wert von 0,0658. (B) Die einfaktorielle Analyse der Varianz (ANOVA) ergab einen p-Wert von 0,3239. (C) Die einfaktorielle Analyse der Varianz (ANOVA) ergab einen p-Wert von 0,1511.

4.5 Effektive Hemmung von Zellteilung durch Volasertib *in vitro*

Die Wirkung von Volasertib auf maligne Zellen beruht sowohl auf der Hemmung von Proliferation (Barr et al., 2004) als auch auf der Induktion von Apoptose (Liu et al., 2003). Für den Angriffspunkt von Volasertib im Zellzyklus ist Zellproliferation Voraussetzung. Proliferation primärer Zellen *in vitro* ist nur unter optimalen Kulturbedingungen möglich. Um diese Voraussetzung als erfüllt zu sehen, wurde

eine Analyse des *in vitro*-Proliferationsverhaltens der mononukleären Knochenmarkszellen anhand des CFSE-Verteilungsmusters mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Abbildung 3 zeigt, dass die Zellkulturbedingungen für gesunde Knochenmarkszellen ausreichend waren und Proliferation stattfand. Zudem liefert Abbildung 3 den Nachweis, dass Volasertib proliferationshemmend auf diese Zellen wirkte. Nach der Behandlung mit Volasertib (1 μM) konnte in der viablen CD34⁺ Zellpopulation keine Proliferation detektiert werden (blauer Graph). Unter DMSO hingegen wurde eine Zellteilung nachgewiesen (roter Graph). Beide Tatsachen konnten auch für die CD34⁺ MDS-Zelle nachgewiesen werden (Abbildung 4). Zellteilung konnte in den vorliegenden Versuchsbedingungen stattfinden und mittels Volasertib (1 μM) inhibiert werden. Sowohl in der gesunden als auch in der MDS-Zelle ging der Nachweis von Proliferationshemmung mit effektiver Induktion von Zelltod einher (Viabilität nach 72 Stunden 39,68% bzw. 50,21%). Somit wurde nachgewiesen, dass Proliferation *in vitro* unter den gegebenen Zellkulturbedingungen möglich war. Dies stellte den Ansatzpunkt für die proliferationshemmende Wirkung von Volasertib dar. Zusätzlich wurde in Abhängigkeit von der Proliferationshemmung eine effektive Induktion von Zelltod beobachtet.

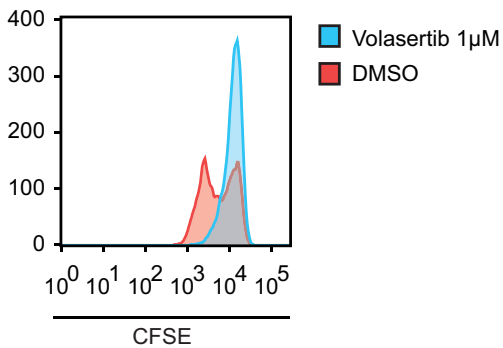


Abbildung 3: Hemmung der *in vitro*-Proliferation von gesunden CD34⁺ Knochenmarkszellen

MACS-aufgereinigte CD34⁺ Knochenmarkszellen eines beispielhaften gesunden Kontrollprobanden wurden mit CFSE gefärbt und 72 Stunden mit DMSO und Volasertib 1 μM inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Viabilität und des CFSE-Verteilungsmusters unter DMSO (rot) und Volasertib 1 μM (blau) mittels Durchflusszytometrie. Die Messung der Viabilität erfolgte nach Anfärbung von Annexin V und 7-AAD und stellt den Quotienten aus viablen Zellen unter Inhibitor und viablen Zellen unter Lösungsmittelkontrolle dar. Die Viabilität nach 72 Stunden betrug 39,68%.

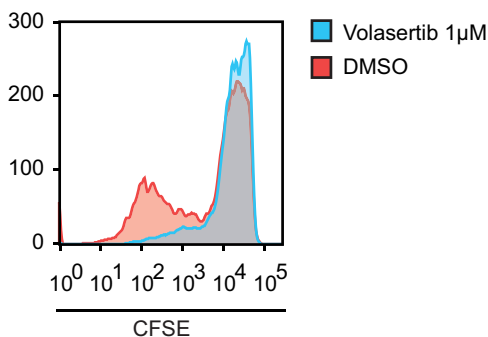


Abbildung 4: Hemmung der *in vitro*-Proliferation von CD34⁺ Knochenmarkszellen eines MDS-Patienten

Mononukleäre Knochenmarkszellen eines beispielhaften Patienten mit MDS (WHO-Klassifikation MDS MLD) wurden mit CFSE gefärbt und 72 Stunden mit DMSO und Volasertib 1 μM inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Viabilität und des CFSE-Verteilungsmusters unter DMSO (rot) und Volasertib 1 μM (blau) mittels Durchflusszytometrie in der CD34⁺ Subpopulation. Die Messung der Viabilität erfolgte nach Anfärbung von Annexin V und 7-AAD und stellt den Quotienten aus viablen Zellen unter Inhibitor und viablen Zellen unter Lösungsmittelkontrolle dar. Die Viabilität nach 72 Stunden betrug 50,21%.

4.6 Induktion von Zelltod durch Volasertib in CD34⁺ Knochenmarkszellen von Patienten mit MDS und sAML

Zur Evaluation der optimalen Behandlungsdauer mit dem PLK1-Inhibitor wurde die Viabilität der CD34⁺ mononukleären Zellen vor Inhibitorbehandlung und nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation mit dem Inhibitor Volasertib in einer Konzentration von 1 µM gemessen und mit der Viabilität unter Lösungsmittelkontrolle verglichen. Die Viabilität wurde durchflusszytometrisch durch die Anfärbung von Annexin V und 7-AAD bestimmt. Nach 72 Stunden Inhibitorbehandlung sank die Viabilität der Zellen unter Inhibitorbehandlung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle deutlich (Abbildung 5A und B). Deshalb wurde im Folgenden eine Inhibitorbehandlung für 72 Stunden als Standard festgelegt.

Betrachtet man eine große Kohorte von 53 Patientenproben (Abbildung 5C), zeigt sich, dass Volasertib in einer Konzentration von 1 µM in den CD34⁺ Knochenmarkszellen effektiv Zelltod induzieren konnte. Die mittlere Viabilität aller behandelten Knochenmarksproben nach 72 Stunden Inhibitorbehandlung betrug 62,08% (n = 53). Die Induktion von Zelltod war unabhängig von der Stadieneinteilung nach WHO (Abbildung 5C). Es wurden keine Unterschiede zwischen Früh- und Spätformen der MDS detektiert. Eine bisher nicht genauer definierbare Subpopulation bleibt gegenüber PLK1-Inhibition resistent (Abbildung 5D). Die grau markierten Patienten aus Abbildung 5C und D finden sich in Abbildung 6 wieder.

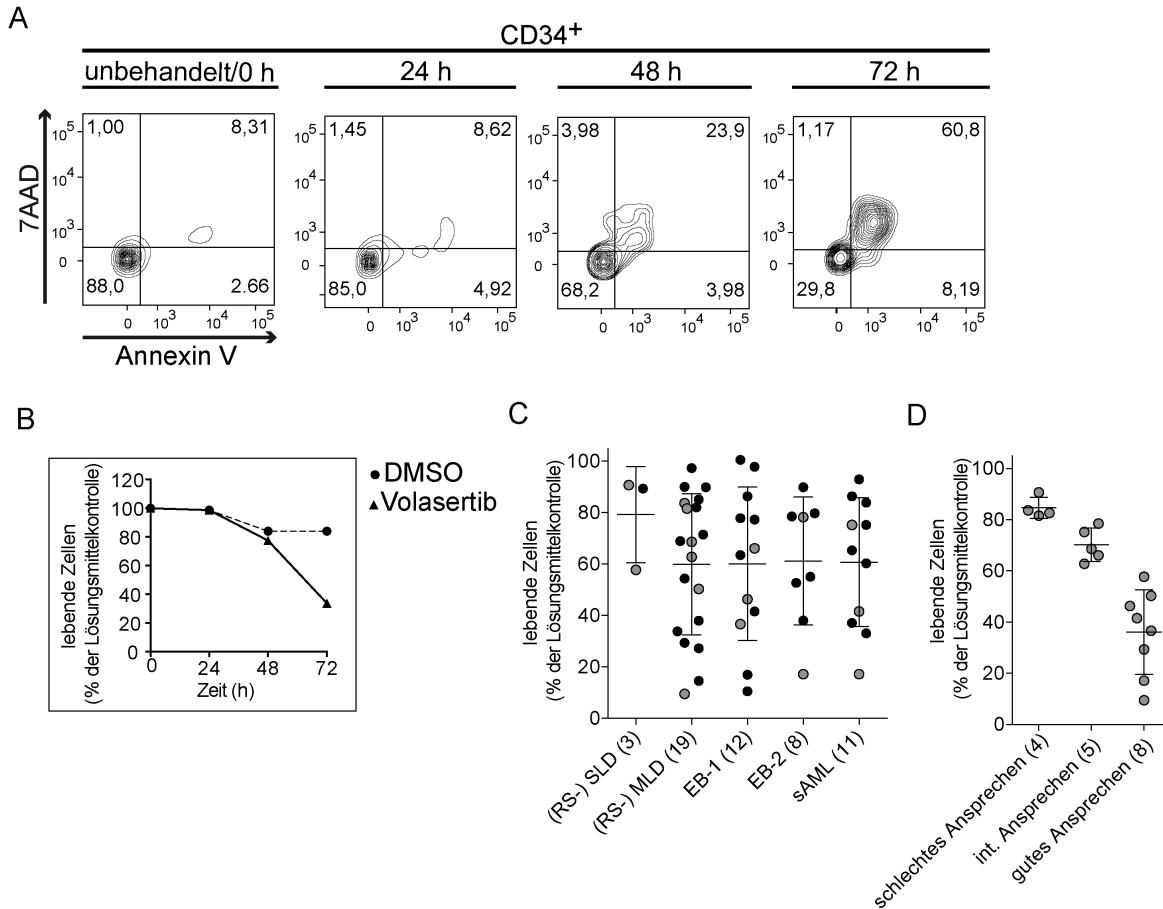


Abbildung 5: Volasertib induziert Zelltod in CD34⁺ Knochenmarkszellen von Patienten mit MDS und sAML

(A) Die Viabilität der CD34⁺ Zellen wurde vor Inhibitorzugabe und zum angegebenen Zeitpunkt nach Inhibitorbehandlung mit Volasertib 1 µM mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Isolation der Zellen erfolgte aus Knochenmark eines beispielhaften Patienten mit sAML. (B) Die Viabilität der Zellen aus (A) wurde als Anteil an den viablen Zellen unter DMSO 1:1000 zu den angegebenen Zeitpunkten dargestellt. (C) Viabilität der CD34⁺ Zellen von 53 MDS und sAML-Proben, die gemäß WHO-Klassifikation als MDS mit Dysplasie in einer Zellreihe (MDS-SLD), MDS mit Dysplasie in einer Zellreihe und Ringsideroblasten (MDS RS-SLD), MDS mit multilineärer Dysplasie (MDS-MLD), MDS mit multilineärer Dysplasie und Ringsideroblasten (MDS RS-MLD), MDS mit Blastenexzess <10% (MDS EB-1), MDS mit Blastenexzess > 10% (MDS EB-2) und sekundärer akuter myeloischer Leukämie (sAML) sind dargestellt. Die grau markierten Punkte finden sich in (D) und Abbildung 6 wieder. (D) Die Viabilität der CD34⁺ Zellen von 53 MDS/sAML-Proben, die in schlechte Ansprecher (Viabilität ≥ 80%), intermediäre Ansprecher (Viabilität ≥ 60%) und gute Ansprecher (Viabilität < 60%) unterteilt wurden. Alle: Die Viabilität der CD34⁺ BMMNC wurde, wenn nicht anders angegeben, nach 72 Stunden

Inhibitorbehandlung durchflusszytometrisch nach Anfärbung von Annexin V und 7-AAD gemessen und stellt den Quotienten aus viablen Zellen unter Inhibitor und viablen Zellen unter Lösungsmittelkontrolle dar. Die Zahl in Klammern beschreibt die Anzahl der analysierten Proben.

4.7 Reduktion der Kolonienbildungsfähigkeit durch Volasertib

MDS sind klonale Erkrankungen, die durch die Transformation der hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzelle entstehen (Jaiswal et al., 2014; Woll et al., 2014). Um den Effekt von Volasertib auf die hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzelle darzustellen und eine mögliche Langzeitwirkung zu aufzuzeigen, wurden Versuche zur Kolonienbildung mit BMMNC von Patienten mit MDS und sAML durchgeführt. Die Inhibitorbehandlung erfolgte wie bei den Versuchen zur Zelltodinduktion für 72 Stunden in Flüssigkultur. Danach wurden die Zellen in Inhibitor-freie und mit Wachstumsfaktoren angereicherte Methylcellulose überführt und die Bildung von Kolonien beobachtet. Die Auszählung und morphologische Charakterisierung der Kolonien wurde nach 14 Tagen durchgeführt. Die Inhibitorbehandlung mit Volasertib (1 μM) reduzierte die Kolonienbildungskapazität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle drastisch (Mittlere Kolonienanzahl = 26 vs. 4) (Abbildung 6). Das traf für alle Kolonienarten zu, wobei CFU-GEMM und BFU-E unter Volasertib (1 μM) nicht beobachtet werden konnten. Jedoch war der Anteil dieser Kolonienarten an der Gesamtzahl auch unter DMSO nur sehr gering.

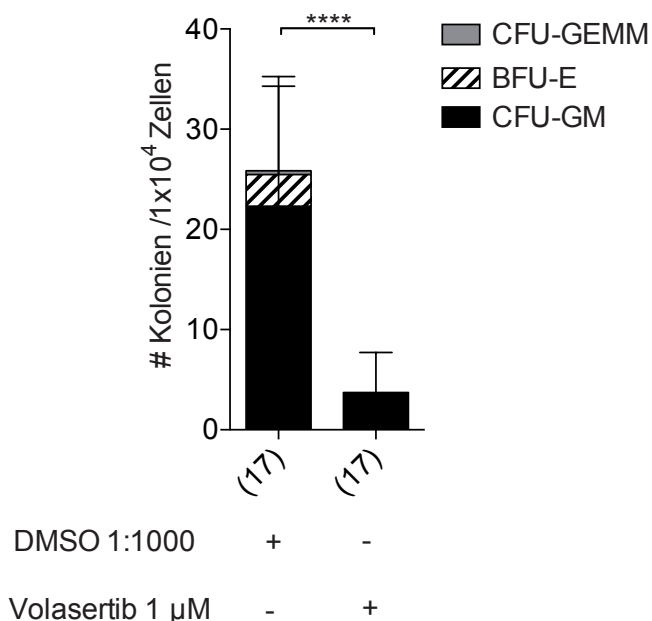


Abbildung 6: Volasertib reduziert die Kolonienbildungskapazität drastisch

BMMNC (1×10^4) wurden in mit Wachstumsfaktoren angereicherter Methylcellulose nach 72 Stunden Behandlung mit Volasertib $1 \mu\text{M}$ ausplattiert. Die Anzahl der CFU-GEMM, CFU-GM und BFU-E sowie die Gesamtzahl der Kolonien wurden nach 14 Tagen bestimmt. Abgebildet ist jeweils die Gesamtzahl der koloniebildenden Einheiten pro 1×10^4 Zellen mit den jeweiligen Anteilen der Koloniearten unter Lösungsmittelkontrolle und Volasertib. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der Koloniearten. Es handelt sich um 10 Niedrigrisiko-MDS- (IPSS niedrig + intermediär-1) und 7 Hochrisiko-MDS (intermediär-2 und hoch)/sAML-Proben. Es gab keinen Unterschied zwischen den einzelnen IPSS-Risikogruppen. Der signifikante Unterschied zwischen Inhibitorbehandlung und Lösungsmittelkontrolle wurde bezogen auf die Gesamtzahl der Kolonien berechnet. Der p-Wert des unabhängigen t-Tests beträgt $< 0,0001$. Die Zahl in Klammern beschreibt die Anzahl der analysierten Proben.

4.8 Schonung der gesunden Hämatopoese durch niedrigdosiertes Volasertib

MDS- und sAML-Patienten sind aufgrund von Alter und Komorbiditäten häufig nicht für intensive Therapieschemata geeignet. Es werden dringend neue Therapien benötigt, die neben einer guten Wirksamkeit auch verträglich bezüglich des Nebenwirkungsprofils sind. Eine wichtige unerwünschte Wirkung von vielen antitumoralen Therapien ist eine Myelosuppression, die bei starker Ausprägung

therapielimitierend sein kann. Auch in der klinischen Studie mit Volasertib in AML (POLO-AML-2) wurden ausgeprägte Zytopenien und infektiöse Komplikationen beobachtet (Boehringer Ingelheim, 2016). Deshalb stellt sich hier die Frage, welche Auswirkungen Volasertib auf die verbleibende Resthämatopoese ausübt und welche Dosierungen knochenmarksschonend sind.

Da der Anteil der CD34⁺ Zellen an allen mononukleären Zellen im gesunden Knochenmark nur 1% - 4% beträgt (Servida et al., 1996), wurde für die Experimente zur Induktion von Zelltod mit gesundem Knochenmark eine Aufreinigung der CD34⁺ Zellen durchgeführt, um den Inhibitoreffekt an einer ausreichend großen Zellpopulation darstellen zu können. Als optimale Behandlungsdauer der Zellen wurde für die erkrankten MDS-Zellen eine Zeit von 72 Stunden etabliert. Dieser Messzeitpunkt wurde für das gesunde Knochenmark übernommen.

Zur Evaluation einer Dosierung, die die gesunde Hämatopoese verschont, wurden Dosis titrationsexperimente durchgeführt. Die Gesamtheit der BMMNC bleibt gegenüber Zelltodinduktion durch Volasertib in allen getesteten Konzentrationen weitestgehend unbeeinflusst (Abbildung 7A). Hingegen wurden in der angereicherten CD34⁺ Population der BMMNC toxische Effekte durch Volasertib insbesondere in Dosierungen ab 50 nM beobachtet (Abbildung 7B). Hochdosiertes Volasertib - jedoch nicht niedrigdosiertes (≤ 10 nM) - ist zytotoxisch für die gesunden CD34⁺ mononukleären Zellen. Mit niedrigdosiertem Volasertib (≤ 10 nM) findet keine Induktion von Zelltod statt. Die mittlere Viabilität unter 10 nM Volasertib betrug 98,15% (versus 34,72% unter 50 nM). Betrachtet man den Effekt von Volasertib im Koloniebildungsassay, zeigt sich ein ähnliches Ergebnis wie in den durchflusszytometrischen Analysen. Hier ist der Unterschied zwischen 10 nM und 50 nM noch auffälliger. Die Kolonienbildungsfähigkeit bleibt bis zu einer Konzentration von 10 nM vollkommen unbeeinträchtigt (Abbildung 7C). Die Anzahl und Größe der Kolonien unter diesen Konzentrationen unterscheidet sich nicht von der Anzahl und Größe der Kolonien unter Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 7C). Beispielhafte Kolonien sind in Abbildung 7E gezeigt. Ab einer Konzentration von 50 nM ist die Gesamtzahl der Kolonien jedoch drastisch reduziert. Es können nur noch einzelne und in ihrer Größe verringerte koloniebildende Einheiten gezählt werden.

Vergleicht man den Anteil der koloniebildenden Einheiten unter Volasertib 10 nM an den koloniebildenden Einheiten unter Lösungsmittelkontrolle (DMSO) in MDS- und gesundem Knochenmark (Abbildung 7D), wird der spezifische Effekt auf die MDS-Stamm-/ und Vorläuferzelle deutlich. Hier wird die Gesamtzahl der Kolonien durch Volasertib 10 nM drastisch dezimiert (Kolonien 25,72%), wohingegen die gesunde Hämatopoese unbeeinflusst bleibt (Kolonien 94,50%).

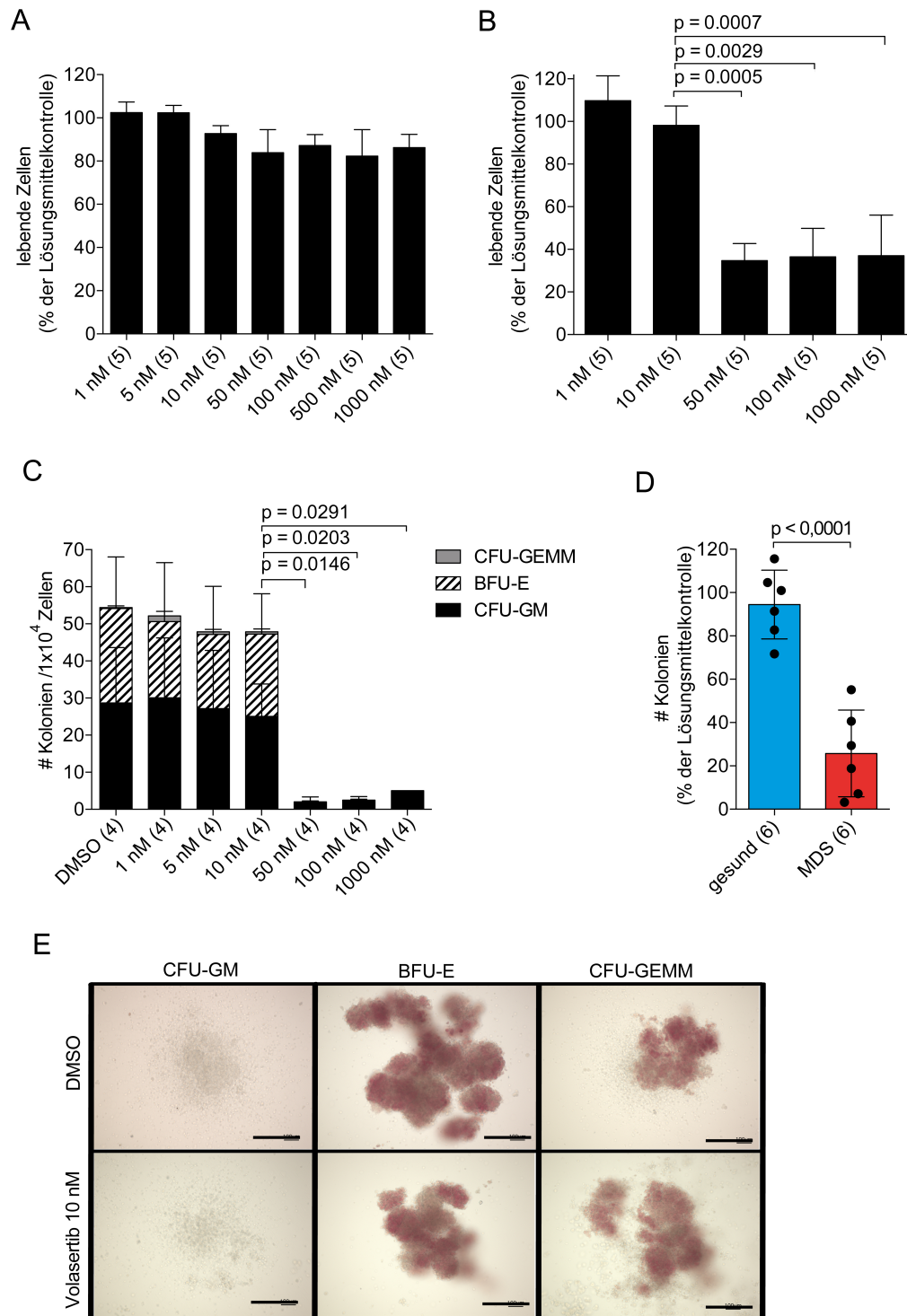


Abbildung 7: Niedrigdosiertes Volasertib ist nicht toxisch für gesundes Knochenmark

(A) Gezeigt ist die Viabilität gesunder BMMNC in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen. (B) Gezeigt ist die Viabilität gesunder CD34⁺ Knochenmarkszellen in

Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen. (A+B) Die Viabilität wurde nach 72 Stunden Inhibitorbehandlung durchflusszytometrisch nach Anfärbung von Annexin V und 7-AAD gemessen und stellt den Quotienten aus viablen Zellen unter Inhibitor und viablen Zellen unter Lösungsmittelkontrolle dar. Die Zahl in Klammern beschreibt die Anzahl der analysierten Proben. Die p-Werte der verbundenen t-Tests sind angegeben. (C) Gesunde BMMNC (1×10^4) wurden in mit Wachstumsfaktoren angereicherter Methylcellulose nach 72 Stunden Behandlung mit Volasertib in den angegebenen Konzentrationen und Lösungsmittelkontrolle (DMSO) ausplattiert. Die Anzahl der CFU-GEMM, CFU-GM und BFU-E sowie die Gesamtzahl der Kolonien wurden nach 14 Tagen bestimmt. Abgebildet ist jeweils die Gesamtzahl der koloniebildenden Einheiten pro 1×10^4 Zellen mit den jeweiligen Anteilen der Koloniearten unter Lösungsmittelkontrolle und Volasertib. Dargestellt ist der Mittelwert mit den Standardabweichungen der Kolonienarten. Die p-Werte der verbundenen t-Tests sind angegeben. (D) Gezeigt ist der Quotient aus der Gesamtzahl der koloniebildenden Einheiten unter Lösungsmittelkontrolle (DMSO) und Volasertib (10 nM) aus gesunden (blau) und MDS-BMMNCs (rot). Der p-Wert des unverbundenen t-Tests ist angegeben. (E) Abgebildet sind beispielhafte koloniebildende Einheiten von CFU-GEMM, CFU-GM, BFU-E von gesundem Knochenmark sowohl nach Behandlung mit Lösungsmittelkontrolle als auch mit Volasertib (10 nM). Weder die Anzahl noch die Größe der Kolonien war unter Inhibitorbehandlung mit Volasertib (10 nM) vermindert. Der Messbalken entspricht 300 μ M.

4.9 Induktion von Zelltod und Reduktion der Kolonienbildungsfähigkeit durch niedrigdosiertes Volasertib in CD34⁺ Zellen der MDS- und sAML-Patienten

Um bei der Therapie von Patienten mit MDS und sAML schwerwiegende Nebenwirkungen durch zu hohe Toxizität auf die gesunde Hämatopoese zu vermeiden, muss die geringste wirksame Dosis gefunden werden. Die Versuche am gesunden Knochenmark zeigten, dass Volasertib in einer Konzentration von 10 nM die gesunde Hämatopoese nicht beeinträchtigt (4.8). Setzt man Volasertib in einer Konzentration von 10 nM beim erkrankten Knochenmark ein, zeigt sich der spezifische zytotoxische Effekt auf die MDS-Stamm-/Vorläuferzelle. Die BMMNC wurden für 72 Stunden mit dem Inhibitor (Konzentration 10 nM) inkubiert. Die Viabilität der CD34⁺ Zellen ist nach Inhibitorbehandlung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle deutlich reduziert (Abbildung 8A). Dies geschieht unabhängig von der Stadieneinteilung nach WHO (Abbildung 8B). Die durchflusszytometrischen

Effekte zeigen sich auch im Koloniebildungsassay. Die Zellen wurden nach 72 Stunden Inhibitorbehandlung mit Volasertib 10 nM in die Inhibitor-freie und mit Wachstumsfaktoren angereicherte Methylcellulose gegeben. Nach 14 Tagen konnten im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant weniger Kolonien gezählt werden (Abbildung 8C). Dies betraf die beobachteten Kolonienarten CFU-GM und BFU-E gleichermaßen. Auch die Größe der einzelnen Kolonien war unter Volasertib 10 nM verringert (Abbildung 8D).

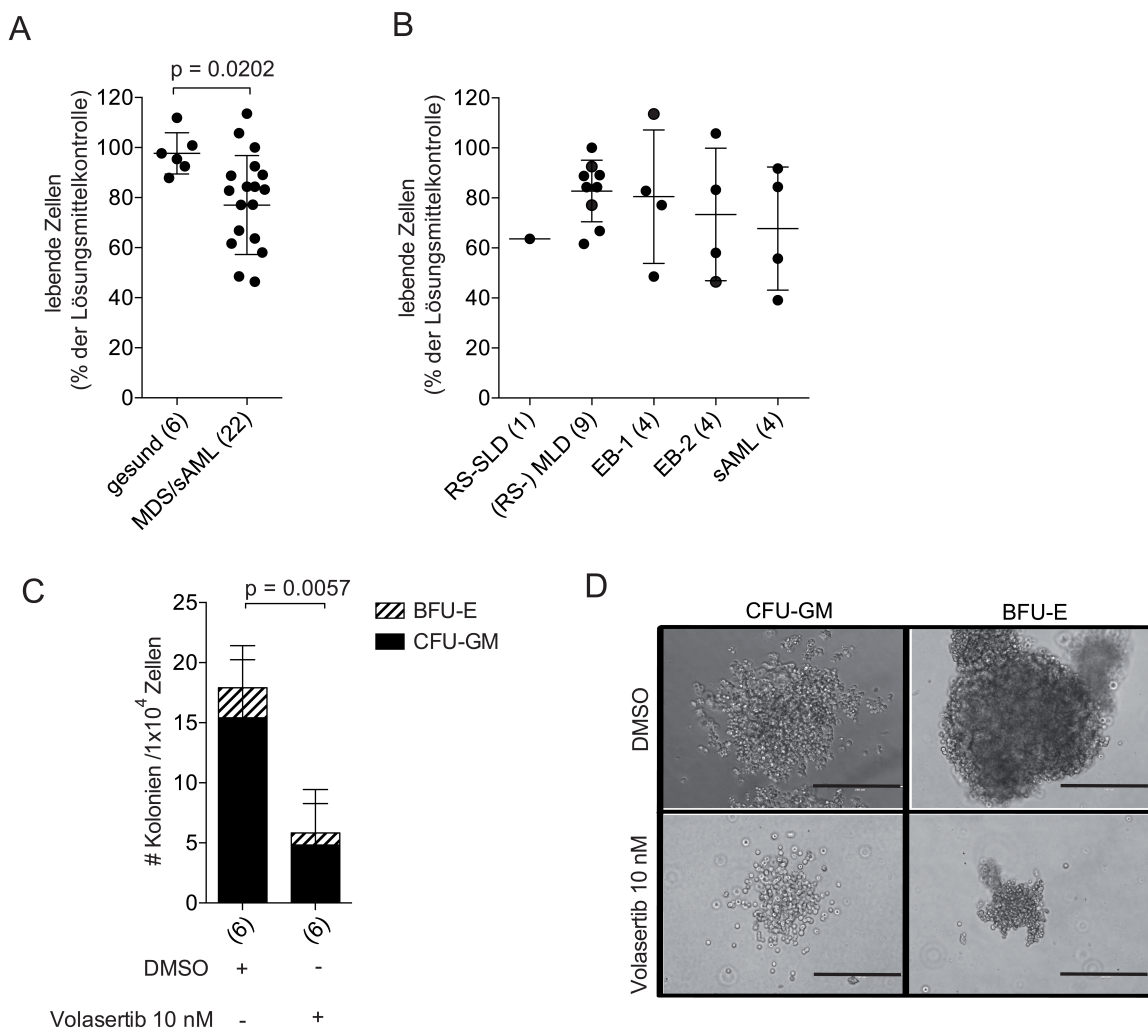


Abbildung 8: Niedrigdosiertes Volasertib wirkt zytotoxisch auf die Stamm-/Vorläuferzelle von MDS und sAML und reduziert die Kolonienbildungsfähigkeit (A) Gezeigt ist die Viabilität $CD34^+$ mononukleärer Knochenmarkszellen von gesundem und MDS- und sAML-Knochenmark nach 72 Stunden Behandlung mit

Volasertib (10 nM). (B) Gezeigt ist die Viabilität CD34⁺ mononukleärer Knochenmarkzellen der links dargestellten MDS und sAML-Proben, die gemäß WHO-Klassifikation als MDS mit Dysplasie in einer Zellreihe und Ringsideroblasten (MDS RS-SLD), MDS mit Dysplasie in mehreren Zellreihen (MDS-MLD), MDS mit Dysplasie in mehreren Zellreihen und Ringsideroblasten (MDS RS-MLD), MDS mit Blastenexzess <10% (MDS EB-1), MDS mit Blastenexzess > 10% (MDS EB-2) und sekundärer akuter myeloischer Leukämie (sAML) dargestellt sind. (A+B) Die Viabilität wurde nach 72 Stunden Inhibitorbehandlung durchflusszytometrisch nach Anfärbung von Annexin V und 7-AAD gemessen und stellt den Quotienten aus viablen Zellen unter Inhibitor und viablen Zellen unter Lösungsmittelkontrolle dar. (C) BMMNC (1×10^4) wurden in Inhibitor-freier und mit Wachstumsfaktoren angereicherter Methylcellulose nach 72 Stunden Behandlung mit Lösungsmittelkontrolle (DMSO) oder Volasertib (10 nM) ausplattiert. Die Anzahl der CFU-GEMM, CFU-GM und BFU-E sowie die Gesamtzahl der Kolonien wurden nach 14 Tagen ausgezählt. Abgebildet ist jeweils die Gesamtzahl der koloniebildenden Einheiten pro 1×10^4 Zellen mit den jeweiligen Anteilen der Koloniearten unter Lösungsmittelkontrolle und Volasertib. Dargestellt ist der Mittelwert mit den Standardabweichungen der Kolonienarten. Der signifikante Unterschied zwischen Inhibitorbehandlung und Lösungsmittelkontrolle wurde bezogen auf die Gesamtzahl der Kolonien berechnet. Es handelt sich um 4 Niedrigrisiko- und 2 Hochrisiko-MDS-Patienten. (D) Abgebildet sind beispielhafte koloniebildende Einheiten CFU-GM und BFU-E von Knochenmark von einem Patienten mit Hochrisiko-MDS nach Behandlung mit Lösungsmittelkontrolle oder Volasertib 10 nM. Der Messbalken entspricht 200 µm. Alle: Die Zahl in Klammern beschreibt die Anzahl der analysierten Proben. Die p-Werte der unabhängigen t-Tests sind angegeben.

4.10 Der Effekt von niedrigdosiertem Volasertib beruht sowohl auf Zelltodinduktion als auch auf Proliferationshemmung

Die Versuche zur Koloniebildungskapazität mit niedrigdosiertem Volasertib (10 nM) mit den BMMNC von Patienten mit MDS (Abbildung 7C) demonstrierten deutlich eine gute Effektivität im Sinne einer Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit. Dies wurde bei allen durchgeführten Knochenmarksproben beobachtet (n = 6). Volasertib werden zum einen proliferationshemmende (Barr et al., 2004) zum anderen aber auch direkt zytotoxische Wirkungen (Liu et al., 2003) zugeschrieben. Deshalb stellte sich die Frage, welche der beschriebenen Effekte der Wirkstoff auf die BMMNC unter den vorliegenden Versuchsbedingungen ausübt. Bei allen sechs Patientenproben

aus Abbildung 8C wurden parallel zum Koloniebildungsassay die durchflusszytometrischen Analysen zur Viabilität durchgeführt und die Ergebnisse sodann gegenübergestellt (Abbildung 9). Für die Knochenmarkszellen von Patient 4 (Pt 4) galt, dass bereits im durchflusszytometrischen Kurzzeitassay mit Volasertib (10 nM) ein deutlicher zytotoxischer Effekt beobachtet werden konnte (Viabilität 58,06%). Im Langzeitassay zur Kolonienbildung zeigte sich eine noch ausgeprägtere Wirkung. Die Koloniebildungskapazität unter Volasertib war im Vergleich zu derer unter Lösungsmittelkontrolle (DMSO) deutlich reduziert (Kolonien 3,23%). Bei den Versuchen mit den Zellen von Patienten 3 (Pt 3) fiel auf, dass, auch wenn nach 72 Stunden noch kein zytotoxischer Effekt auf die Zellen beobachtet werden konnte (Viabilität 113,60%), durch die Inhibitorbehandlung die Koloniebildung nach 14 Tagen im Sinne einer verringerten Gesamtzahl an Kolonien deutlich reduziert war (Kolonien 40,63%). Dies zeigt, dass Volasertib in einer Konzentration von 10 nM nicht nur direkt zytotoxische Wirkung auf die Zellen ausübt, sondern auch potente proliferations- und differenzierungshemmende Effekte hat.

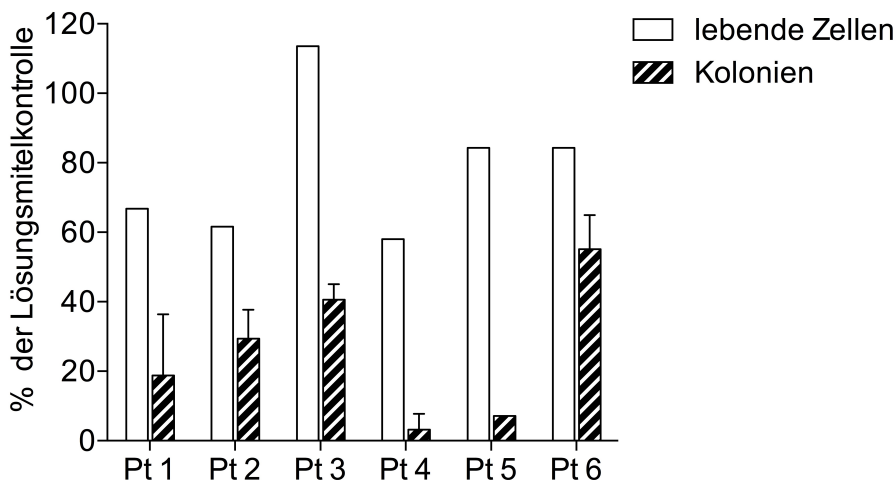


Abbildung 9: Der Effekt von niedrigdosiertem Volasertib beruht sowohl auf Zelltodinduktion als auch auf Proliferationshemmung

Anhand sechs verschiedener MDS-Patienten (Pt 1-6) wird die Wirksamkeit von Volasertib 10 nM im Kurz- (durchflusszytometrische Viabilitätsmessung nach 72 Stunden) dem Langzeiteffekt (Auszählung koloniebildender Einheiten nach 14 Tagen) gegenübergestellt. Es handelt sich um die Patienten aus Abbildung 8C (4 Niedrigrisiko- und 2 Hochrisiko-MDS-Patienten). Gezeigt ist die Viabilität CD34⁺

mononukleärer Knochenmarkzellen von MDS-Knochenmark nach 72 Stunden Behandlung mit Volasertib (10 nM). Die Viabilität wurde nach 72 Stunden Inhibitorbehandlung durchflusszytometrisch nach Anfärbung von Annexin V und 7AAD gemessen und stellt den Quotienten aus viablen Zellen unter Inhibitor und viablen Zellen unter Lösungsmittelkontrolle dar. BMMNC (1×10^4) wurden in mit Wachstumsfaktoren angereicherter Methylcellulose nach 72 Stunden Behandlung mit Lösungsmittelkontrolle (DMSO) oder Volasertib (10 nM) ausplattiert. Die Anzahl der – GEMM, CFU-GM und BFU-E sowieso die Gesamtzahl der Kolonien wurden nach 14 Tagen ausgezählt. Gezeigt ist der Quotient aus der Gesamtzahl der kolonienbildenden Einheiten pro 1×10^4 Zellen unter Lösungsmittelkontrolle (DMSO) und Volasertib (10 nM) aus den BMMNC.

4.11 Dosisabhängige Toxizität des selektiven PLK1-Inhibitors GSK461364A auf die gesunde Knochenmarkszelle

Zum Vergleich der Effekte des PLK1-Inhibitors Volasertib auf die gesunden Knochenmarkszellen mit einem anderen Inhibitor wurden Dosistitratonsversuche mit dem selektiven PLK1-Inhibitor GSK461364A durchgeführt. GSK461364A hat eine höhere Selektivität und hemmt PLK1 mit einer IC_{50} von 0,5 nM (die IC_{50} für PLK2 und PLK3 betragen 860 nM und 1000 nM) (Gilmartin et al., 2009). Die IC_{50} -Werte von Volasertib werden mit 0,87 nM für PLK1, 5 nM für PLK2 und 56 nM für PLK3 angegeben (Rudolph et al., 2009). In den Versuchen zur Dosistitration mit GSK461364A in gesundem und alterskorreliertem Knochenmark zeigte sich, dass der Wirkstoff in den niedrigen Konzentrationen von 1 nM und 5 nM weder im Gesamtknochenmark noch in den $CD34^+$ Knochenmarkszellen Zelltod induziert (Abbildung 10). Nach der Inkubation mit GSK461364A in höheren Konzentrationen (20 - 40 nM) war die Viabilität nach 72 Stunden hingegen deutlich reduziert. Dies betraf sowohl das Gesamtknochenmark als auch noch ausgeprägter die $CD34^+$ Knochenmarkszellen. Diese Versuche decken sich mit den Ergebnissen mit niedrigdosiertem Volasertib (siehe 4.8), nämlich dass die Inhibition von PLK1 in niedrigen Dosierungen nicht toxisch für gesundes Knochenmark ist.

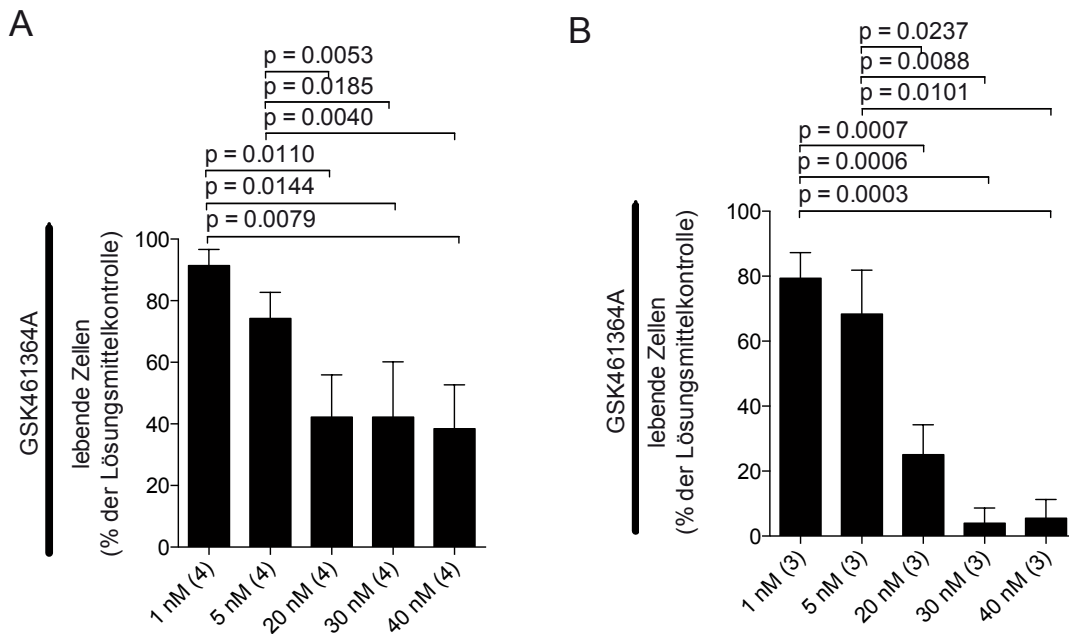


Abbildung 10: Dosisabhängige Toxizität des selektiven PLK1-Inhibitors GSK461364A auf die gesunde Knochenmarkszelle

(A) Gezeigt ist die Viabilität gesunder BMMNC (n = 4) in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen von GSK461364A. (B) Gezeigt ist die Viabilität gesunder CD34⁺ Knochenmarkszellen (n = 3) in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen von GSK461364A. (A+B) Die Viabilität wurde nach 72 Stunden Inhibitorbehandlung durchflusszytometrisch nach Anfärbung von Annexin V und 7-AAD gemessen und stellt den Quotienten aus viablen Zellen unter Inhibitor und viablen Zellen unter Lösungsmittelkontrolle dar. Gezeigt ist die mittlere Viabilität mit den Werten der Standardabweichungen. Die Zahl in Klammern beschreibt die Anzahl der analysierten Proben. Die einfaktoriellen Analysen der Varianz ergaben jeweils einen p-Wert < 0,0001 und die p-Werte der verbundenen t-Tests sind angegeben.

4.12 MCL-1 als potenzieller Biomarker für das Ansprechen auf Volasertib

In den Experimenten zur Induktion von Zelltod wurde in einer Kohorte von 53 Patienten mit MDS und sAML gezeigt, dass Volasertib in einer Konzentration von 1 µM die Viabilität der CD34⁺ Knochenmarkszellen nach 72 Stunden deutlich reduzieren kann. Eine klinisch nicht zu differenzierende Untergruppe an 16 Patienten (30,2%) wies jedoch eine Resistenz (definiert als viable Zellen > 80%) gegenüber Volasertib in den Viabilitätsanalysen auf (siehe Abbildung 5). Um die Patienten zu identifizieren, die optimal von einer Therapie mit Volasertib profitieren, wurden

potentielle Biomarker evaluiert. Da Zusammenhänge zwischen PLK1 und MCL-1 beschrieben wurden (Hikichi et al., 2012; Nair et al., 2015), wurde in der vorliegenden Arbeit eine kleine Gruppe von Patienten auf das Proteinlevel von MCL-1 analysiert und die Höhe der Expression mit dem Ansprechen auf Volasertib korreliert. Es handelte sich um jeweils zwei Patienten mit MDS EB-1 und sAML. Hier zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Höhe des MCL-1-Proteinlevels und der Reduktion der viablen Zellen im Viabilitätsassay. Es kann somit postuliert werden, dass MCL-1 ein potentieller Biomarker für das Ansprechen auf Volasertib im Viabilitätsassay nach 72 Stunden ist, der in einer größeren Kohorte validiert werden sollte.

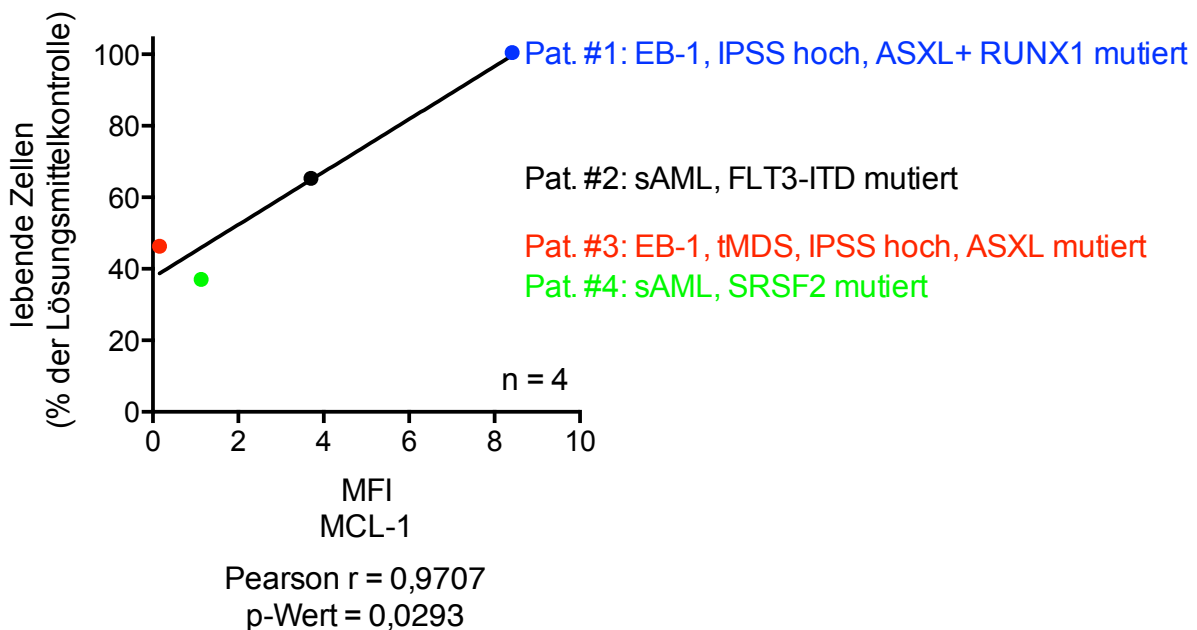


Abbildung 11: MCL-1 vermittelt Resistenz gegenüber einer Zelltodinduktion nach 72 Stunden Inhibitorbehandlung mit Volasertib

Die Höhe der Proteinexpression wurde in den BMMNC vor Inhibitorbehandlung mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie gemessen. Zudem erfolgte die Behandlung der BMMNC mit Volasertib in einer Konzentration von 1 µM über 72 Stunden. Die Viabilität wurde durchflusszytometrisch nach Anfärbung von Annexin V und 7AAD bestimmt und ist als Quotient aus viablen Zellen unter Inhibitor und viablen Zellen unter Lösungsmittelkontrolle dargestellt. Die Proteinexpression wird durch die mittlere fluoreszierende Intensität (MFI) ausgedrückt, die aus dem Verhältnis zur Isotypkontrolle berechnet wurde. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson sowie der P-Wert sind abgebildet.

5 DISKUSSION

5.1 Bewertung des verwendeten Patienten- und Kontrollkollektivs

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Versuche zur Zelltodinduktion insgesamt 75 primäre Knochenmarksaspirate von Patienten mit MDS und sAML verwendet. Eine große Stärke dieser Arbeit liegt in der alleinigen Verwendung von primärem humanen Knochenmarksmaterial, da Zelllinien die Heterogenität von MDS und sAML nicht adäquat abbilden und die verfügbaren MDS-Zelllinien ungenügend charakterisiert sind (Drexler et al., 2009).

In der Literatur wird für MDS-Patienten bei Diagnosestellung ein medianes Alter von 76 Jahren beschrieben (Ma et al., 2007). Das mediane Alter der Kohorte für die vorliegende Arbeit betrug 73 Jahre. Der Zeitpunkt der Knochenmarksentnahme entsprach nicht zwingend dem der Diagnosestellung, da Material auch von Patienten unter Therapie oder im therapiefreien Verlauf analysiert wurde. Das Patientenmaterial wurde dabei unabhängig vom Therapieregime der Patienten in die Studie aufgenommen. Zwar kann nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass applizierte Therapien *in vivo* die Inhibitorbehandlung *in vitro* beeinflussen, die Versuche des Koloniebildungsassays zeigten jedoch, dass eine Inhibition von PLK1 unabhängig von vorangegangenen oder laufenden Therapien wirksam ist, da alle Proben ein Ansprechen auf Volasertib zeigten (Abbildung 6 + Abbildung 8).

Als gesundes Kontrollmaterial diente alterskorreliertes Knochenmark, das aus 25 humanen Hüftköpfen gewonnen wurde, die im Rahmen von orthopädischen Operationen explantiert und sonst verworfen worden wären. Patienten mit (hämato-) onkologischen Erkrankungen in der Anamnese oder auffälligem Blutbild wurden von der Analyse ausgeschlossen. Das mediane Alter der Kontrollprobanden zum Zeitpunkt der Knochenmarksanalyse betrug 64 Jahre (47 bis 82 Jahre), das der Patienten mit MDS und sAML 73 Jahre (41 bis 86 Jahre). Obwohl die Versuche zur Proliferationskapazität keine Altersabhängigkeit zeigten (siehe 4.4), wurde dennoch alterskorreliertes Knochenmark verwendet, um mögliche Einflüsse von im Alter erworbenen Mutationen zu minimieren.

5.2 Inhibition von PLK1 induziert Zelltod und reduziert die Kolonienbildung

Die Versuche zur Induktion von Zelltod wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit an einer Kohorte von MDS- und sAML-Patienten durchgeführt (n = 53). Durch die durchflusszytometrische Messung der Viabilität via Anfärbung von Annexin V und 7-AAD wurde in den CD34⁺ Zellen das Ansprechen auf Volasertib in einer Konzentration von 1 µM gemessen. Dabei fiel auf, dass die Viabilität der einzelnen Patientenproben nach 72 Stunden Inkubation mit Volasertib sehr divergierte. Es gab sowohl primäre mononukleäre Knochenmarkszellen, die keinerlei Ansprechen im Sinne einer Reduktion der Viabilität zeigten, und im Gegensatz dazu auch welche, die sehr sensibel auf Volasertib reagierte (viable Zellen < 10 %) (Abbildung 5).

Für 17 Patienten wurde parallel zur Messung der Viabilität nach 72 Stunden ein Koloniebildungsassay durchgeführt (grau markierte Punkte in Abbildung 5). Dazu wurden die Zellen nach 72 Stunden Inhibitor- oder Lösungsmittelbehandlung in die mit Wachstumsfaktoren angereicherte und Inhibitor-freie Methylcellulose gegeben, um das Kolonienwachstum zu beobachten. Der Koloniebildungsassay diente zur Detektion der längerfristigen Effekte auf die hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzelle. Hier zeigte sich, dass in allen Patientenproben (n = 17) die Koloniebildungsfähigkeit unter Volasertib in einer Konzentration von 1 µM im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle deutlich herabgesetzt war (Abbildung 6). Diese Unterschiede im Therapieansprechen (Viabilität nach 72 Stunden Inkubation mit dem Inhibitor) wurden auch mit niedrigdosiertem Volasertib (10 nM) detektiert (Abbildung 8). Stellt man nun die Effekte aus Viabilitätsmessung und Koloniebildungsfähigkeit gegenüber, fällt auf, dass die CD34⁺ Knochenmarkszellen der MDS- und sAML-Patienten, die nach der Behandlung mit niedrigdosiertem Volasertib im 72 Stunden-Viabilitätsassay nicht (Viabilität > 80%) oder moderat (Viabilität > 60%) abstarben, trotzdem einen deutlichen Effekt im Sinne einer drastischen Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit nach 14 Tagen im Koloniebildungsassay zeigten (Abbildung 9).

Es ist bereits bekannt, dass der Effekt von Volasertib auf die maligne Zelle sowohl auf der Induktion von Apoptose (Liu et al., 2003) als auch von Zellzyklusarrest beruht (Barr et al., 2004). Basierend auf den hier diskutierten Daten kann die Hypothese aufgestellt werden, dass neben einem kurzfristigen direkt zytotoxischen Effekt Volasertib effektiv

zum Zellzyklusarrest führt, was sich in einer verminderten Kolonienbildung nach 14 Tagen äußert.

5.3 Bedeutung der Selektivität von verschiedenen PLK-Inhibitoren für gesundes und krankes Knochenmark

In den Experimenten zur Dosistitration von Volasertib mit gesundem Knochenmark fiel auf, dass für die gesunden BMMNC eine Konzentration von 50 nM eine Schwellendosis darzustellen scheint. Niedrigere Dosierungen (1 nM - 10 nM) schädigten die gesunde Hämatopoese nicht, während ab 50 nM deutliche zytotoxische Effekte auftraten. Eine Erklärung für diesen auffälligen Sprung könnte sein, dass ab 50 nM die Selektivität von Volasertib abnimmt und zusätzlich vermehrt PLK2 (IC_{50} 5 nM) und PLK3 inhibiert werden (IC_{50} 56 nM) (Rudolph et al., 2009). Die simultane Inhibition von PLK1 mit PLK2 und PLK3 könnte im Vergleich zur alleinigen PLK1-Hemmung nachteilig für die antitumorale Wirkung sein, da *PLK2* und *PLK3* als Tumorsuppressorgene agieren (Dai et al., 2003; Eckerdt et al., 2005; Helmke et al., 2016), PLK3 an Reparaturvorgängen von DNA-Schäden beteiligt ist (Zitouni et al., 2014) und eine entscheidende Rolle bei Reaktionen auf verschiedene Arten von Zellstress (wie z. B. mitotischer, oxidativer oder hypoxischer Stress) einnimmt (Helmke et al., 2016). Intakte Reparaturvorgänge von DNA-Schäden und adäquate Stressantworten sind essenziell für das Überleben gesunder Zellen. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der Versuche mit dem selektiveren PLK1-Inhibitor GSK461364A, zeigt sich, dass auch dieser in niedrigen Dosierungen erhebliche zytotoxische Effekt auf gesunde BMMNC ausübt. Dies ist der Fall, obwohl die IC_{50} -Werte von GSK461364A mit 860 nM für PLK2 und 1000 nM für PLK3 (Gilmartin et al., 2009) deutlich über denen von Volasertib (5 nM und 56 nM) (Rudolph et al., 2009) lagen und den in den durchgeführten Versuchen mit Konzentrationen bis 50 nM weitaus nicht überschritten wurden. Dies befürwortet den Einsatz von niedrigdosiertem Volasertib.

Es wurden neben Volasertib (BI 6727) und GSK461364A (Gilmartin et al., 2009) weitere PLK-Inhibitoren entwickelt wie BI 2536 (Steehmaier et al., 2007; Renner et al., 2009), NMS-P937 (Valsasina et al., 2012) und ON01910 (Gumireddy et al., 2005). BI 2536 war einer der ersten PLK1-Inhibitoren auf dem Markt, der sich in präklinischen

Untersuchungen als effektiv erwiesen hat (Steeigmaier et al., 2007; Renner et al., 2009). Diese Wirkung konnte jedoch in klinischen Studien mit unterschiedlichen Tumorentitäten nicht ausreichend bestätigt werden (Schoffski et al., 2010; Sebastian et al., 2010; Mross et al., 2012; Muller-Tidow et al., 2013; Awad et al., 2017), weshalb das Augenmerk auf andere PLK1-Inhibitoren gerichtet wurde (siehe 1.2.3). Jedoch liegen für BI 2536 Daten zu Versuchen mit gesunden Zellen vor.

So ist bereits publiziert, dass der PLK-Inhibitor BI 2536 eine ähnliche Wirkung auf AML- wie auf nicht-leukämische Zelllinien hat und somit unspezifisch Zelltod induziert (Münch et al., 2015). Als methodische Unterschiede zur vorliegenden Arbeit sind anzuführen, dass Münch *et al.* den PLK-Inhibitor BI 2536 (vs. BI6727 in der vorliegenden Arbeit) in (AML-) Zelllinien (vs. BMMNC von MDS- und sAML-Patienten und gesunden Kontrollen in der vorliegenden Arbeit) getestet haben. Als nicht-leukämische Kontrollzelllinien wurden zwei lymphoblastoide Zelllinien (LCL1/-2) verwendet. Die AML- und Kontrollzelllinien wurden zur Bestimmung der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) mit verschiedenen Konzentrationen von BI 2536 behandelt. Dabei konnte im Ansprechen kein Unterschied zwischen AML- und Kontrollzelllinie detektiert werden (EC_{50} der AML-Zelllinien 5,3 nM bis 21,0 nM und EC_{50} der Kontrollzelllinien 7,7 nM und 10,0 nM) (Münch et al., 2015).

Es ist im Gegensatz dazu besonders interessant, dass in den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuchen Volasertib in einer Konzentration von 10 nM selbst in den primären humanen Knochenmarkszellen von 25 gesunden und alterskorrelierten Kontrollen keine zytotoxischen Effekte hervorgerufen hat. Wurde jedoch Knochenmark von Patienten mit MDS und sAML mit Volasertib in einer Konzentration von 10 nM behandelt, konnte sowohl eine Reduktion der Viabilität nach 72 Stunden als auch eine massive Verminderung der Kolonienbildungsfähigkeit erzielt werden. Dies demonstrierte die spezifische Wirkung von Volasertib auf die kranke Knochenmarkszelle.

Zudem zeigte BI 2536 im Koloniebildungsassay mit normalen $CD34^+$ Nabelschnurzellen in den Konzentrationen 1 nM und 10 nM keine Toxizität auf die Koloniebildungsfähigkeit der gesunden Stamm- und Vorläuferzelle (Renner et al., 2009). Eine Titration mit höheren Dosierungen wurde nicht beschrieben. In den für die

vorliegende Arbeit durchgeführten Versuchen zeigte der PLK1-Inhibitor Volasertib (BI 6727) in den oben genannten Konzentrationen ebenfalls keine zytotoxischen Effekte auf gesunde Knochenmarkszellen. Diese ergaben sich erst bei höheren Dosierungen. Die Spezifität der Inhibitoren BI 2536 und BI 6727 ist dabei mit IC_{50} -Werten für PLK1 von 0,83 nM und 0,87 nM nahezu identisch (Helmke et al., 2016). Trotzdem bleibt offen, inwiefern die beiden Wirkstoffe vergleichbar sind, da sie sich mindestens in den IC_{50} -Werten für PLK2 und PLK3 unterscheiden (Helmke et al., 2016).

5.4 Drastische Dosisreduktion von Volasertib verringert kritische Hämatotoxizität bei erhaltener Wirksamkeit

Volasertib inhibiert in niedrigen Konzentrationen hochselektiv PLK1 und hat eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 0,87 nM (Helmke et al., 2016). In der hier vorliegenden Arbeit konnte in *in vitro*-Versuchen gezeigt werden, dass Volasertib in einer Konzentration von 10 nM in gesunden Knochenmarkszellen keinen Zelltod induziert und die Koloniebildungsfähigkeit nicht beeinträchtigt (siehe 4.8). Dies gilt sowohl für die Population der $CD34^+$ Stamm-/Vorläuferzellen als auch für das gesamte Knochenmark. Aus publizierten Pharmakokinetikdaten der Phase I-Studie zur Dosisescalation von Volasertib in fünf Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren ergaben sich im Gegensatz dazu interessanterweise deutlich höhere Plasmakonzentrationen nach Verwendung der Standarddosierung von 350 mg intravenösem Volasertib (Schoffski et al., 2012; Döhner et al., 2014). Die maximale Plasmakonzentration reichte bis 600 ng/ml (1000 nM). Außerdem fiel die Plasmakonzentration innerhalb von 14 Tagen nicht unter 10 ng/ml (16,66 nM) (Schoffski et al., 2012). Die im klinischen Rahmen gemessenen Plasmakonzentrationen liegen also insbesondere mit den Spitzenwerten deutlich über der Konzentration von 10 nM, für die in der vorliegenden Arbeit eine Schonung des gesunden Knochenmarks festgestellt wurde.

Die *in vitro*-Versuche mit hochdosiertem Volasertib verdeutlichen die *in vivo* beobachteten unerwünschten Wirkungen im Sinne einer Myelosuppression, die im Rahmen der POLO-AML-2-Studie auftraten und zum Stopp der Studie führten (Boehringer Ingelheim, 2016). Für eine bessere Verträglichkeit und weniger

unerwünschte Wirkungen durch ausgeprägte Hämatotoxizität ist eine drastische Dosisreduktion im klinischen Rahmen notwendig.

5.5 Volasertib mit gezielter Wirkung auf Stamm-/Vorläuferzelle von MDS- und sAML-Patienten

Bei Nachweis erhöhter Hämatotoxizität der Volasertibdosierungen von 50 nM bis 1 µM im Gesunden wurde die Wirkung von niedrigeren Dosierungen im erkrankten Knochenmark getestet. Interessanterweise zeigte sich für das Knochenmark der MDS- und sAML-Patienten trotz Dosisreduktion eine vergleichbare Effektivität, während gleichzeitig die gesunde Hämatopoese geschont wird (siehe 4.9). Zu den potenziellen Ursachen für die selektive Wirkung auf die Stamm-/Vorläuferzelle der MDS- und sAML-Patienten gehören molekulare Veränderungen in den Strukturen des Zellzyklus, die die Sensitivität für Zellzyklusmodulatoren erhöhen. Möglicherweise liegt der Grund in der veränderten Genexpression von *PLK1* und *PLK3* (Abbildung 1). Die durchgeführten Genexpressionsanalysen zeigten, dass *PLK1* in den mononukleären Knochenmarkszellen von MDS-Patienten höher exprimiert ist als in gesunden und nicht-leukämischen Kontrollen (Abbildung 1A und D). Diese Ergebnisse bestätigen vorhandene Daten aus der Literatur, wo beschrieben ist, dass *PLK1* sowohl in zahlreichen soliden Tumoren (Wolf et al., 1997; Takahashi et al., 2003; Weichert et al., 2005a; Weichert et al., 2005b; Weichert et al., 2005c; He et al., 2009) als auch in akuten myeloischen Leukämien (Renner et al., 2009) hochreguliert ist. In der Literatur wurde bereits mehrmals diskutiert, dass sowohl das Tumorstadium als auch das Ansprechen auf die Therapie mit einem PLK1-Inhibitor von einer erhöhten PLK1-Aktivität abhängig sind (Liu et al., 2006; Strebhardt et al., 2006; Luo et al., 2009; Renner et al., 2009). Dies ermöglicht durch die selektive Inhibition von PLK1 ein gezieltes Abtöten der Tumorzelle ohne der gesunden hämatopoetischen Zelle zu schaden (Archambault et al., 2015). Diese Veränderungen könnten erklären, warum sich Volasertib bis zu einer Konzentration von 10 nM spezifisch gegen die MDS-Stamm-/Vorläuferzelle richtet.

Zusätzlich ist das Expressionslevel von *PLK3* in den Kontrollproben im Vergleich zu den MDS-Knochenmarkszellen erhöht (Abbildung 1C und F). Für die Relevanz von

Veränderungen des *PLK3*-Expressionslevels liegen noch keine eindeutigen Daten vor. In Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs sowie in Lungen- und hepatozellulären Karzinomen scheint *PLK3* runterreguliert zu sein (Li et al., 1996; Dai et al., 2000; Pellegrino et al., 2010). Bei den hepatozellulären Karzinomen ist dies gleichzeitig mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Im Gegensatz dazu ist aber auch die erhöhte Expression von *PLK3* in Brust- und Ovarialtumoren prognostisch ungünstig (Weichert et al., 2004; Weichert et al., 2005b).

5.6 Das anti-apoptotische Protein MCL-1 als vielversprechender Biomarker für Volasertibsensitivität

Für eine zielgerichtete Therapie mit günstigem Nebenwirkungsprofil ist die Identifizierung der Patienten notwendig, die am besten von einer Therapie mit Volasertib profitieren. Als potenzielle Biomarker für die Sensitivität von Volasertib wurden bisher die *PLK1*-Expression (Münch et al., 2015), der Mutationsstatus von *TP53* (Liu et al., 2006; Sur et al., 2009; Wang et al., 2013) und das Expressionslevel von *MCL-1* (Hikichi et al., 2012) diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss einer *TP53*-Mutation auf das Ansprechen auf Volasertib in einer Konzentration von 1 μ M nach 72 Stunden untersucht. Hier zeigte sich, dass 30 Patienten den Wildtyp des *TP53*-Gens und sieben eine nachgewiesene Mutation hatten. Es konnte jedoch kein Unterschied im Therapieansprechen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die *PLK1*-Expression selbst wurde bereits als Biomarker diskutiert (Münch et al., 2015). In einer klinischen Studie mit Volasertib in Ovarialkarzinomen, konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (Pujade-Lauraine et al., 2016) werden.

Ein bekannter Resistenzfaktor für Tumorthapien ist ein erhöhtes Expressionslevel von *MCL-1* (Yasui et al., 2004). So konnte zum Beispiel für die Therapien mit dem BCL-2/-XL/-W-Inhibitor ABT-737 und dem BCL-2-selektiven Inhibitor ABT-199 gezeigt werden, dass ein hohes *MCL-1*-Level Resistenz gegenüber den Wirkstoffen vermittelt (Jilg et al., 2015) und der Effekt unabhängig von Hochrisikomutationen in den Genen *ASXL1*, *RUNX1*, *TP53* und *EZH2* ist (Reidel et al., 2018). *MCL-1* scheint auch eine Rolle für die Funktion von *PLK1* zu spielen. In einer Studie mit dem *PLK1*-Inhibitor TAK-960 (Hikichi

et al., 2012) konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff in Sarkom-Zelllinien abhängig von der Suppression von MCL-1 Apoptose induziert (Nair et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit konnten die Hinweise für MCL-1 als potenziellen Biomarker für eine Therapie mit einem PLK1-Inhibitor bestätigt werden. Eine hohe Proteinexpression von MCL-1 vermittelte in einer kleinen Kohorte von Patienten mit MDS und sAML Resistenz gegenüber Volasertib in einer Konzentration von 1 μ M nach 72 Stunden Inhibitorbehandlung.

6 ZUSAMMENFASSUNG

MDS gehören zu den häufigsten hämatoonkologischen Erkrankungen des älteren Menschen (Germing et al., 2013) und gehen mit einem erhöhten Risiko der Transformation in eine akute myeloische Leukämie einher (Tefferi et al., 2009). Die Prognose ist insbesondere für Hochrisiko-MDS-Patienten sehr schlecht (Greenberg et al., 2012). Es werden dringend neue Therapiestrategien benötigt, da die einzig kurative Therapie der allogenen Stammzelltransplantation nur für sehr wenige Patienten in Frage kommt (Malcovati et al., 2013). Die hohe Proliferationsrate im Knochenmark (Parker et al., 2000; Alexandrakis et al., 2004; Matarraz et al., 2012) von Patienten mit MDS und sAML stellt ein attraktives Ziel für eine Therapie mit PLK1-Inhibitoren dar. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte daher erarbeitet werden, ob die Inhibition von PLK1 als wirksame und verträgliche Therapiestrategie für Patienten mit MDS und sAML in Betracht kommt.

In den Analysen von Genexpressionsdaten aus öffentlich zugänglichen Datenbanken zeigte sich, dass die mononukleären Knochenmarkszellen von Patienten mit MDS eine höhere Expression von *PLK1* als die von Kontrollprobanden aufwiesen. Dies stellt einen vielversprechenden Angriffspunkt einer Therapie mit einem PLK1-Inhibitor dar.

BMMNC von Patienten mit MDS und sAML wurden *in vitro* mit dem PLK1-Inhibitor Volasertib behandelt. Nach 72 Stunden folgte die Messung der Viabilität. Um die langfristige Wirkung auf die hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzelle darzustellen, wurden Koloniebildungsassays durchgeführt. Als Kontrollmaterial diente Knochenmark, das aus explantierten Hüftköpfen von hämatologisch gesunden und alterskorrelierten Patienten isoliert wurde. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Volasertib in einer Konzentration von 1 μM in den primären humanen CD34^+ Knochenmarkszellen von Patienten mit MDS und sAML effektiv Zelltod induziert und die Kolonienbildungsfähigkeit drastisch reduziert. Diese hohen Dosierungen, die auch im Rahmen von klinischen Studien (POLO-AML-2) zum Einsatz kamen (Boehringer Ingelheim, 2016), zeigten jedoch in den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimenten *in vitro* eine ausgeprägte Toxizität auf die gesunde Hämatopoese. Die Viabilität der CD34^+ Knochenmarkszellen von den gesunden Kontrollprobanden war nach 72 Stunden massiv reduziert. Ebenfalls war die Anzahl der Kolonien im

Koloniebildungsassay bei der Konzentration von 1 μ M stark dezimiert. Damit könnten zumindest zum Teil die schwerwiegenden Nebenwirkungen wie schwere Zytopenien und infektiöse Komplikationen in den klinischen Studien erklärt werden.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten zudem, dass eine 100-fache Dosisreduktion von Volasertib auf 10 nM die *in vitro*-Toxizität auf die gesunde hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzelle auf ein Minimum reduzierte. Gleichzeitig wird jedoch mit der Konzentration von 10 nM in den MDS- und sAML-Stamm-/Vorläuferzellen selektiv Zelltod induziert und die Kolonienbildungsfähigkeit vermindert. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen daher deutlich für eine beträchtliche Dosisreduktion von Volasertib, um unter Erhaltung der Effektivität die ausgeprägten Nebenwirkungen zu reduzieren.

Auch konnte gezeigt werden, dass die Toxizität des selektiven PLK1-Inhibitors GSK461364A dosisabhängig ist und insbesondere in den niedrigen Konzentrationen von 1 - 5 nM keinen Zelltod in den gesunden BMMNC induziert. Nach Inkubation mit einer höheren Dosis (20 - 40 nM) wird effektiv Zelltod induziert. Im Vergleich zu Volasertib erwies sich dieser Inhibitor trotz höherer Selektivität nicht als schonender für die gesunde Hämatopoese.

MCL-1 wurde als potenzieller Biomarker für das Ansprechen auf den PLK1-Inhibitor Volasertib identifiziert. Die Induktion von Zelltod war abhängig von einer Suppression des Proteinlevels von MCL-1. Anhand eines Screenings vor Einleitung einer Therapie können im klinischen Einsatz die Patienten bestimmt werden, die maximal von der Therapie profitieren können.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Ackermann, S., F. Goeser, J. H. Schulte, A. Schramm, V. Ehemann, B. Hero, A. Eggert, F. Berthold und M. Fischer (2011). "Polo-like kinase 1 is a therapeutic target in high-risk neuroblastoma." Clin Cancer Res 17(4): 731-41.

Ades, L., R. Itzykson und P. Fenaux (2014). "Myelodysplastic syndromes." Lancet 383(9936): 2239-52.

Ahr, A., T. Karn, C. Solbach, T. Seiter, K. Strebhardt, U. Holtrich und M. Kaufmann (2002). "Identification of high risk breast-cancer patients by gene expression profiling." Lancet 359(9301): 131-2.

Albitar, M., T. Manshouri, Y. Shen, D. Liu, M. Beran, H. M. Kantarjian, A. Rogers, I. Jilani, C. W. Lin, S. Pierce, E. J. Freireich und E. H. Estey (2002). "Myelodysplastic syndrome is not merely "preleukemia"." Blood 100(3): 791-8.

Alexandrakis, M. G., F. H. Passam, D. S. Kyriakou, C. Dambaki, G. Katrinakis, G. Tsirakis, J. Konsolas und E. N. Stathopoulos (2004). "Expression of the proliferation-associated nuclear protein MIB-1 and its relationship with microvascular density in bone marrow biopsies of patients with myelodysplastic syndromes." J Mol Histol 35(8-9): 857-63.

Andrysik, Z., W. Z. Bernstein, L. Deng, D. L. Myer, Y. Q. Li, J. A. Tischfield, P. J. Stambrook und M. Bahassi el (2010). "The novel mouse Polo-like kinase 5 responds to DNA damage and localizes in the nucleolus." Nucleic Acids Res 38(9): 2931-43.

Arber, D. A., A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M. J. Borowitz, M. M. Le Beau, C. D. Bloomfield, M. Cazzola und J. W. Vardiman (2016). "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia." Blood 127(20): 2391-405.

Archambault, V., G. Lepine und D. Kachaner (2015). "Understanding the Polo Kinase machine." Oncogene 34(37): 4799-807.

Arquint, C. und E. A. Nigg (2016). "The PLK4-STIL-SAS-6 module at the core of centriole duplication." Biochem Soc Trans 44(5): 1253-63.

Awad, M. M., Q. S. Chu, L. Gandhi, J. J. Stephenson, R. Govindan, D. S. Bradford, P. D. Bonomi, D. M. Ellison, K. D. Eaton, H. Fritsch, G. Munzert, B. E. Johnson und M. A. Socinski (2017). "An open-label, phase II study of the polo-like kinase-1 (Plk-1) inhibitor, BI 2536, in patients with relapsed small cell lung cancer (SCLC)." Lung Cancer 104: 126-30.

Bacher, U., T. Haferlach, W. Kern, T. Weiss, S. Schnittger und C. Haferlach (2009). "The impact of cytomorphology, cytogenetics, molecular genetics, and

immunophenotyping in a comprehensive diagnostic workup of myelodysplastic syndromes." Cancer 115(19): 4524-32.

Bahassi el, M., C. W. Conn, D. L. Myer, R. F. Hennigan, C. H. McGowan, Y. Sanchez und P. J. Stambrook (2002). "Mammalian Polo-like kinase 3 (Plk3) is a multifunctional protein involved in stress response pathways." Oncogene 21(43): 6633-40.

Barr, F. A., H. H. Sillje und E. A. Nigg (2004). "Polo-like kinases and the orchestration of cell division." Nat Rev Mol Cell Biol 5(6): 429-40.

Basch, E., B. B. Reeve, S. A. Mitchell, S. B. Clauser, L. M. Minasian, A. C. Dueck, T. R. Mendoza, J. Hay, T. M. Atkinson, A. P. Abernethy, D. W. Bruner, C. S. Cleeland, J. A. Sloan, R. Chilukuri, P. Baumgartner, A. Denicoff, D. St Germain, A. M. O'Mara, A. Chen, J. Kelaghan, A. V. Bennett, L. Sit, L. Rogak, A. Barz, D. B. Paul und D. Schrag (2014). "Development of the National Cancer Institute's patient-reported outcomes version of the common terminology criteria for adverse events (PRO-CTCAE)." J Natl Cancer Inst 106(9).

Bejar, R., R. Levine und B. L. Ebert (2011a). "Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes." J Clin Oncol 29(5): 504-15.

Bejar, R., K. Stevenson, O. Abdel-Wahab, N. Galili, B. r. Nilsson, G. Garcia-Manero, H. Kantarjian, A. Raza, R. L. Levine, D. Neuberg und B. L. Ebert (2011b). "Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes." New England Journal of Medicine 364(26): 2496-506.

Bernasconi, P., C. Klersy, M. Boni, P. M. Cavigliano, S. Calatroni, I. Giardini, B. Rocca, R. Zappatore, M. Caresana, J. Quarna, M. Lazzarino und C. Bernasconi (2005). "Incidence and prognostic significance of karyotype abnormalities in de novo primary myelodysplastic syndromes: a study on 331 patients from a single institution." Leukemia 19(8): 1424-31.

Bernasconi, P., C. Klersy, M. Boni, P. M. Cavigliano, I. Dambrosio und R. Zappatore (2013). "Validation of the new comprehensive cytogenetic scoring system (NCCSS) on 630 consecutive de novo MDS patients from a single institution." Am J Hematol 88(2): 120-9.

Bettencourt-Dias, M., A. Rodrigues-Martins, L. Carpenter, M. Riparbelli, L. Lehmann, M. K. Gatt, N. Carmo, F. Balloux, G. Callaini und D. M. Glover (2005). "SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development." Curr Biol 15(24): 2199-207.

Boehringer Ingelheim (2016). "Results of Phase III study of volasertib for the treatment of acute myeloid leukaemia presented at European Hematology Association Annual Meeting." Online im Internet: <https://www.boehringer-ingelheim.com/press-release/results-phase-iii-study-volasertib-treatment-acute-myeloid-leukaemia-presented>. Stand 22.09.2018.

Brennan, I. M., U. Peters, T. M. Kapoor und A. F. Straight (2007). "Polo-like kinase controls vertebrate spindle elongation and cytokinesis." PLoS One 2(5): e409.

Bu, Y., Z. Yang, Q. Li und F. Song (2008). "Silencing of polo-like kinase (Plk) 1 via siRNA causes inhibition of growth and induction of apoptosis in human esophageal cancer cells." Oncology 74(3-4): 198-206.

Buchner, J. (1999). "Hsp90 & Co. - a holding for folding." Trends Biochem Sci 24(4): 136-41.

Burns, T. F., P. Fei, K. A. Scata, D. T. Dicker und W. S. El-Deiry (2003). "Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells." Mol Cell Biol 23(16): 5556-71.

Chang, C., B. E. Storer, B. L. Scott, E. M. Bryant, H. M. Shulman, M. E. Flowers, B. M. Sandmaier, R. P. Witherspoon, R. A. Nash, J. E. Sanders, A. Bedalov, J. A. Hansen, B. E. Clurman, R. Storb, F. R. Appelbaum und H. J. Deeg (2007). "Hematopoietic cell transplantation in patients with myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia arising from myelodysplastic syndrome: similar outcomes in patients with de novo disease and disease following prior therapy or antecedent hematologic disorders." Blood 110(4): 1379-87.

Christman, J. K. (2002). "5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy." Oncogene 21(35): 5483-95.

Conn, C. W., R. F. Hennigan, W. Dai, Y. Sanchez und P. J. Stambrook (2000). "Incomplete cytokinesis and induction of apoptosis by overexpression of the mammalian polo-like kinase, Plk3." Cancer Res 60(24): 6826-31.

Corey, S. J., M. D. Minden, D. L. Barber, H. Kantarjian, J. C. Wang und A. D. Schimmer (2007). "Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases." Nat Rev Cancer 7(2): 118-29.

Costantini, B., S. Y. Kordasti, A. G. Kulasekararaj, J. Jiang, T. Seidl, P. P. Abellan, A. Mohamedali, N. S. Thomas, F. Farzaneh und G. J. Mufti (2013). "The effects of 5-azacytidine on the function and number of regulatory T cells and T-effectors in myelodysplastic syndrome." Haematologica 98(8): 1196-205.

Culleton, B. F., B. J. Manns, J. Zhang, M. Tonelli, S. Klarenbach und B. R. Hemmelgarn (2006). "Impact of anemia on hospitalization and mortality in older adults." Blood 107(10): 3841-6.

Cutler, C. S., S. J. Lee, P. Greenberg, H. J. Deeg, W. S. Perez, C. Anasetti, B. J. Bolwell, M. S. Cairo, R. P. Gale, J. P. Klein, H. M. Lazarus, J. L. Liesveld, P. L.

- McCarthy, G. A. Milone, J. D. Rizzo, K. R. Schultz, M. E. Trigg, A. Keating, D. J. Weisdorf, J. H. Antin und M. M. Horowitz (2004). "A decision analysis of allogeneic bone marrow transplantation for the myelodysplastic syndromes: delayed transplantation for low-risk myelodysplasia is associated with improved outcome." Blood 104(2): 579-85.
- Dai, W. und J. P. Cogswell (2003). "Polo-like kinases and the microtubule organization center: targets for cancer therapies." Prog Cell Cycle Res 5: 327-34.
- Dai, W., Y. Li, B. Ouyang, H. Pan, P. Reissmann, J. Li, J. Wiest, P. Stambrook, J. L. Gluckman, A. Noffsinger und P. Bejarano (2000). "PRK, a cell cycle gene localized to 8p21, is downregulated in head and neck cancer." Genes Chromosomes Cancer 27(3): 332-6.
- De Carcer, G., B. Escobar, A. M. Higuero, L. Garcia, A. Anson, G. Perez, M. Mollejo, G. Manning, B. Melendez, J. Abad-Rodriguez und M. Malumbres (2011a). "Plk5, a polo box domain-only protein with specific roles in neuron differentiation and glioblastoma suppression." Mol Cell Biol 31(6): 1225-39.
- De Carcer, G., G. Manning und M. Malumbres (2011b). "From Plk1 to Plk5: functional evolution of polo-like kinases." Cell Cycle 10(14): 2255-62.
- De Oliveira, J. C., M. S. Brassesco, J. A. Pezuk, A. G. Morales, E. T. Valera, A. P. Montaldi, E. T. Sakamoto-Hojo, C. A. Scrideli und L. G. Tone (2012). "In vitro PLK1 inhibition by BI 2536 decreases proliferation and induces cell-cycle arrest in melanoma cells." J Drugs Dermatol 11(5): 587-92.
- DeVita, V. T., Jr. und E. Chu (2008). "A history of cancer chemotherapy." Cancer Res 68(21): 8643-53.
- DiNardo, C. D., N. Daver, E. Jabbour, T. Kadia, G. Borthakur, M. Konopleva, N. Pemmaraju, H. Yang, S. Pierce, W. Wierda, C. Bueso-Ramos, K. P. Patel, J. E. Cortes, F. Ravandi, H. M. Kantarjian und G. Garcia-Manero (2015). "Sequential azacitidine and lenalidomide in patients with high-risk myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia: a single-arm, phase 1/2 study." Lancet Haematol 2(1): e12-20.
- DiNardo, C. D., C. R. Rausch, C. Benton, T. Kadia, N. Jain, N. Pemmaraju, N. Daver, W. Covert, K. R. Marx, M. Mace, E. Jabbour, J. Cortes, G. Garcia-Manero, F. Ravandi, K. N. Bhalla, H. Kantarjian und M. Konopleva (2018). "Clinical experience with the BCL2-inhibitor venetoclax in combination therapy for relapsed and refractory acute myeloid leukemia and related myeloid malignancies." Am J Hematol 93(3): 401-7.
- Döhner, H., M. Lübbert, W. Fiedler, L. Fouillard, A. Haaland, J. M. Brandwein, S. Lepretre, O. Reman, P. Turlure, O. G. Ottmann, C. Müller-Tidow, A. Krämer, E. Raffoux, K. Döhner, R. F. Schlenk, F. Voss, T. Taube, H. Fritsch und J. Maertens (2014). "Randomized, phase 2 trial of low-dose cytarabine with or without volasertib in AML patients not suitable for induction therapy." Blood 124(9): 1426-33.

Drexler, H. G., W. G. Dirks und R. A. F. MacLeod (2009). "Many are called MDS cell lines: one is chosen." Leuk Res 33(8): 1011-6.

Eckerdt, F., J. Yuan und K. Strebhardt (2005). "Polo-like kinases and oncogenesis." Oncogene 24(2): 267-76.

Ellis, P. M., N. B. Leigh, V. Hirsh, M. N. Reaume, N. Blais, R. Wierzbicki, B. Sadrolhefazi, Y. Gu, D. Liu, K. Pilz und Q. Chu (2015). "A Randomized, Open-Label Phase II Trial of Volasertib as Monotherapy and in Combination With Standard-Dose Pemetrexed Compared With Pemetrexed Monotherapy in Second-Line Treatment for Non-Small-Cell Lung Cancer." Clin Lung Cancer 16(6): 457-65.

Fenaux, P., A. Giagounidis, D. Selleslag, O. Beyne-Rauzy, G. Mufti, M. Mittelman, P. Muus, P. Te Boekhorst, G. Sanz, C. Del Canizo, A. Guerci-Bresler, L. Nilsson, U. Platzbecker, M. Lubbert, B. Quesnel, M. Cazzola, A. Ganser, D. Bowen, B. Schlegelberger, C. Aul, R. Knight, J. Francis, T. Fu, E. Hellstrom-Lindberg und M. D. S. L. d. q. S. Group (2011). "A randomized phase 3 study of lenalidomide versus placebo in RBC transfusion-dependent patients with Low-/Intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with del5q." Blood 118(14): 3765-76.

Fenaux, P., G. J. Mufti, E. Hellstrom-Lindberg, V. Santini, C. Finelli, A. Giagounidis, R. Schoch, N. Gattermann, G. Sanz, A. List, S. D. Gore, J. F. Seymour, J. M. Bennett, J. Byrd, J. Backstrom, L. Zimmerman, D. McKenzie, C. Beach, L. R. Silverman und M. D. S. S. S. G. International Vidaza High-Risk (2009). "Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study." Lancet Oncol 10(3): 223-32.

Fenaux, P., G. J. Mufti, E. Hellstrom-Lindberg, V. Santini, N. Gattermann, U. Germing, G. Sanz, A. F. List, S. Gore, J. F. Seymour, H. Dombret, J. Backstrom, L. Zimmerman, D. McKenzie, C. L. Beach und L. R. Silverman (2010). "Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia." J Clin Oncol 28(4): 562-9.

Fenaux, P., P. Muus, H. Kantarjian, R. M. Lyons, R. A. Larson, M. A. Sekeres, P. S. Becker, A. Orejudos und J. Franklin (2017). "Romiplostim monotherapy in thrombocytopenic patients with myelodysplastic syndromes: long-term safety and efficacy." Br J Haematol 178(6): 906-13.

Ferlay, J., P. Autier, M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet und P. Boyle (2007). "Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006." Ann Oncol 18(3): 581-92.

Fujii, S., K. Shimizu, V. Klimek, M. D. Geller, S. D. Nimer und M. V. Dhodapkar (2003). "Severe and selective deficiency of interferon-gamma-producing invariant natural killer T cells in patients with myelodysplastic syndromes." Br J Haematol 122(4): 617-22.

Germing, U., G. Kobbe, R. Haas und N. Gattermann (2013). "Myelodysplastic syndromes: diagnosis, prognosis, and treatment." Dtsch Arztebl Int 110(46): 783-90.

Germing, U., C. Strupp, A. Giagounidis, R. Haas, N. Gattermann, C. Starke und C. Aul (2012). "Evaluation of dysplasia through detailed cytomorphology in 3156 patients from the Dusseldorf Registry on myelodysplastic syndromes." Leuk Res 36(6): 727-34.

Gilmartin, A. G., M. R. Bleam, M. C. Richter, S. G. Erskine, R. G. Kruger, L. Madden, D. F. Hassler, G. K. Smith, R. R. Gontarek, M. P. Courtney, D. Sutton, M. A. Diamond, J. R. Jackson und S. G. Laquerre (2009). "Distinct concentration-dependent effects of the polo-like kinase 1-specific inhibitor GSK461364A, including differential effect on apoptosis." Cancer Res 69(17): 6969-77.

Golsteyn, R. M., K. E. Mundt, A. M. Fry und E. A. Nigg (1995). "Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function." J Cell Biol 129(6): 1617-28.

Greenberg, P. L., C. Cox, M. M. LeBeau, P. Fenaux, P. Morel, G. Sanz, M. Sanz, T. Vallespi, T. Hamblin, D. Oscier, K. Ohyashiki, K. Toyama, C. Aul, G. Mufti und J. Bennett (1997). "International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes." Blood 89(6): 2079-88.

Greenberg, P. L., H. Tüchler, J. Schanz, G. Sanz, G. Garcia-Manero, F. Solé, J. M. Bennett, D. Bowen, P. Fenaux, F. Dreyfus, H. Kantarjian, A. Kuendgen, A. Levis, L. Malcovati, M. Cazzola, J. Cermak, C. Fonatsch, M. M. L. Beau, M. L. Slovak, O. Krieger, M. Luebbert, J. Maciejewski, S. M. M. Magalhaes, Y. Miyazaki, M. Pfeilstöcker, M. Sekeres, W. R. Sperr, R. Stauder, S. Tauro, P. Valent, T. Vallespi, A. A. v. d. Loosdrecht, U. Germing und D. Haase (2012). "Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes." Blood 120(12).

Grovdal, M., M. Karimi, M. Tobiasson, L. Reinius, M. Jansson, K. Ekwall, J. Ungerstedt, J. Kere, D. Greco und E. Hellstrom-Lindberg (2014). "Azacitidine induces profound genome-wide hypomethylation in primary myelodysplastic bone marrow cultures but may also reduce histone acetylation." Leukemia 28(2): 411-3.

Guan, R., P. Tapang, J. D. Levenson, D. Albert, V. L. Giranda und Y. Luo (2005). "Small interfering RNA-mediated Polo-like kinase 1 depletion preferentially reduces the survival of p53-defective, oncogenic transformed cells and inhibits tumor growth in animals." Cancer Res 65(7): 2698-704.

Gumireddy, K., M. V. Reddy, S. C. Cosenza, R. Boominathan, S. J. Baker, N. Papathi, J. Jiang, J. Holland und E. P. Reddy (2005). "ON01910, a non-ATP-competitive small molecule inhibitor of Plk1, is a potent anticancer agent." Cancer Cell 7(3): 275-86.

Habedanck, R., Y. D. Stierhof, C. J. Wilkinson und E. A. Nigg (2005). "The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication." Nat Cell Biol 7(11): 1140-6.

Hanahan, D. und R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell 100(1): 57-70.

Hanahan, D. und R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell 144(5): 646-74.

Hansen, D. V., A. V. Loktev, K. H. Ban und P. K. Jackson (2004). "Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1." Mol Biol Cell 15(12): 5623-34.

He, Z. L., H. Zheng, H. Lin, X. Y. Miao und D. W. Zhong (2009). "Overexpression of polo-like kinase1 predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients." World J Gastroenterol 15(33): 4177-82.

Hellstrom-Lindberg, E., R. Negrin, R. Stein, S. Krantz, G. Lindberg, J. Vardiman, A. Ost und P. Greenberg (1997). "Erythroid response to treatment with G-CSF plus erythropoietin for the anaemia of patients with myelodysplastic syndromes: proposal for a predictive model." Br J Haematol 99(2): 344-51.

Helmke, C., S. Becker und K. Strebhardt (2016). "The role of Plk3 in oncogenesis." Oncogene 35(2): 135-47.

Hikichi, Y., K. Honda, K. Hikami, H. Miyashita, I. Kaieda, S. Murai, N. Uchiyama, M. Hasegawa, T. Kawamoto, T. Sato, T. Ichikawa, S. Cao, Z. Nie, L. Zhang, J. Yang, K. Kuida und E. Kupperman (2012). "TAK-960, a novel, orally available, selective inhibitor of polo-like kinase 1, shows broad-spectrum preclinical antitumor activity in multiple dosing regimens." Mol Cancer Ther 11(3): 700-9.

Hu, K., J. H. Law, A. Fotovati und S. E. Dunn (2012). "Small interfering RNA library screen identified polo-like kinase-1 (PLK1) as a potential therapeutic target for breast cancer that uniquely eliminates tumor-initiating cells." Breast Cancer Res 14(1): R22.

Ikezoe, T., J. Yang, C. Nishioka, Y. Takezaki, T. Tasaka, K. Togitani, H. Koeffler und A. Yokoyama (2009). "A novel treatment strategy targeting polo-like kinase 1 in hematological malignancies." Leukemia 23(9): 1564-76.

Irizarry, R. A., B. Hobbs, F. Collin, Y. D. Beazer-Barclay, K. J. Antonellis, U. Scherf und T. P. Speed (2003). "Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data." Biostatistics 4(2): 249-64.

Jaiswal, S. und B. L. Ebert (2014). "MDS is a stem cell disorder after all." Cancer Cell 25(6): 713-4.

Jilg, S., V. Reidel, C. Müller-Thomas, J. König, J. Schauwecker, U. Höckendorf, C. Huberle, O. Gorka, B. Schmidt, R. Burgkart, J. Ruland, H.-J. Kolb, C. Peschel, R. Oostendorp, K. Götze und P. Jost (2015). "Blockade of BCL-2 proteins efficiently induces apoptosis in progenitor cells of high-risk myelodysplastic syndromes patients." Leukemia 30(1): 112-23.

Jimeno, A., B. Rubio-Viqueira, N. V. Rajeshkumar, A. Chan, A. Solomon und M. Hidalgo (2010). "A fine-needle aspirate-based vulnerability assay identifies polo-like kinase 1 as a mediator of gemcitabine resistance in pancreatic cancer." Mol Cancer Ther 9(2): 311-8.

Jordan, M. A. und L. Wilson (2004). "Microtubules as a target for anticancer drugs." Nat Rev Cancer 4(4): 253-65.

Kadia, T. M., E. Jabbour und H. Kantarjian (2011). "Failure of hypomethylating agent-based therapy in myelodysplastic syndromes." Semin Oncol 38(5): 682-92.

Kastan, M. B. und J. Bartek (2004). "Cell-cycle checkpoints and cancer." Nature 432(7015): 316-23.

Khan, H., C. Vale, T. Bhagat und A. Verma (2013). "Role of DNA methylation in the pathogenesis and treatment of myelodysplastic syndromes." Semin Hematol 50(1): 16-37.

Knapp, R., G. Dewald und R. Pierre (1985). "Cytogenetic studies in 174 consecutive patients with preleukemic or myelodysplastic syndromes." Mayo Clin Proc 60(8): 507-16.

Kneisel, L., K. Strebhardt, A. Bernd, M. Wolter, A. Binder und R. Kaufmann (2002). "Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease." J Cutan Pathol 29(6): 354-8.

Kops, G. J., B. A. Weaver und D. W. Cleveland (2005). "On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint." Nat Rev Cancer 5(10): 773-85.

Kordasti, S. Y., B. Afzali, Z. Lim, W. Ingram, J. Hayden, L. Barber, K. Matthews, R. Chelliah, B. Guinn, G. Lombardi, F. Farzaneh und G. J. Mufti (2009). "IL-17-producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome." Br J Haematol 145(1): 64-72.

Kordasti, S. Y., W. Ingram, J. Hayden, D. Darling, L. Barber, B. Afzali, G. Lombardi, M. W. Wlodarski, J. P. Maciejewski, F. Farzaneh und G. J. Mufti (2007). "CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS)." Blood 110(3): 847-50.

Lane, H. A. und E. A. Nigg (1996). "Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes." J Cell Biol 135(6 Pt 2): 1701-13.

Lee, C., A. Fotovati, J. Triscott, J. Chen, C. Venugopal, A. Singhal, C. Dunham, J. M. Kerr, M. Verreault, S. Yip, H. Wakimoto, C. Jones, A. Jayanthan, A. Narendran, S. K. Singh und S. E. Dunn (2012). "Polo-like kinase 1 inhibition kills glioblastoma multiforme brain tumor cells in part through loss of SOX2 and delays tumor progression in mice." Stem Cells 30(6): 1064-75.

Leone, G., L. Teofili, M. T. Voso und M. Lubbert (2002). "DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias." Haematologica 87(12): 1324-41.

Li, B., B. Ouyang, H. Pan, P. T. Reissmann, D. J. Slamon, R. Arceci, L. Lu und W. Dai (1996). "Prk, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas." J Biol Chem 271(32): 19402-8.

Lim, Z., R. Brand, R. Martino, A. van Biezen, J. Finke, A. Bacigalupo, D. Beelen, A. Devergie, E. Alessandrino, R. Willemze, T. Ruutu, M. Boogaerts, M. Falda, J. P. Jouet, D. Niederwieser, N. Kroger, G. J. Mufti und T. M. De Witte (2010). "Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for patients 50 years or older with myelodysplastic syndromes or secondary acute myeloid leukemia." J Clin Oncol 28(3): 405-11.

Lin, C. C., W. C. Su, C. J. Yen, C. H. Hsu, W. P. Su, K. H. Yeh, Y. S. Lu, A. L. Cheng, D. C. Huang, H. Fritsch, F. Voss, T. Taube und J. C. Yang (2014). "A phase I study of two dosing schedules of volasertib (BI 6727), an intravenous polo-like kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies." Br J Cancer 110(10): 2434-40.

List, A., G. Dewald, J. Bennett, A. Giagounidis, A. Raza, E. Feldman, B. Powell, P. Greenberg, D. Thomas, R. Stone, C. Reeder, K. Wride, J. Patin, M. Schmidt, J. Zeldis, R. Knight und I. Myelodysplastic Syndrome-003 Study (2006). "Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion." N Engl J Med 355(14): 1456-65.

Liu, X. und R. L. Erikson (2003). "Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A 100(10): 5789-94.

Liu, X., M. Lei und R. L. Erikson (2006). "Normal cells, but not cancer cells, survive severe Plk1 depletion." Mol Cell Biol 26(6): 2093-108.

Lu, L. Y., J. L. Wood, K. Minter-Dykhouse, L. Ye, T. L. Saunders, X. Yu und J. Chen (2008). "Polo-like kinase 1 is essential for early embryonic development and tumor suppression." Mol Cell Biol 28(22): 6870-6.

- Lu, L. Y. und X. Yu (2009). "The balance of Polo-like kinase 1 in tumorigenesis." Cell Div 4: 4.
- Luo, J., M. J. Emanuele, D. Li, C. J. Creighton, M. R. Schlabach, T. F. Westbrook, K. K. Wong und S. J. Elledge (2009). "A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene." Cell 137(5): 835-48.
- Ma, X., M. Does, A. Raza und S. T. Mayne (2007). "Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States." Cancer 109(8): 1536-42.
- Malcovati, L., U. Germing, A. Kuendgen, M. G. Della Porta, C. Pascutto, R. Invernizzi, A. Giagounidis, B. Hildebrandt, P. Bernasconi, S. Knipp, C. Strupp, M. Lazzarino, C. Aul und M. Cazzola (2007). "Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes." J Clin Oncol 25(23): 3503-10.
- Malcovati, L., E. Hellström-Lindberg, D. Bowen, L. Adès, J. Cermak, C. d. Cañizo, M. G. D. Porta, P. Fenaux, N. Gattermann, U. Germing, J. H. Jansen, M. Mittelman, G. Mufti, U. Platzbecker, G. F. Sanz, D. Selleslag, M. Skov-Holm, R. Stauder, A. Symeonidis, A. A. v. d. Loosdrecht, T. d. Witte und M. Cazzola (2013). "Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet." Blood 122(17).
- Malumbres, M. und M. Barbacid (2001). "To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer." Nat Rev Cancer 1(3): 222-31.
- Malumbres, M. und M. Barbacid (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." Nat Rev Cancer 9(3): 153-66.
- Massague, J. (2004). "G1 cell-cycle control and cancer." Nature 432(7015): 298-306.
- Matarraz, S., C. Teodosio, C. Fernandez, M. Albors, M. Jara-Acevedo, A. Lopez, M. Gonzalez-Gonzalez, M. L. Gutierrez, J. Flores-Montero, C. Cervero, M. Pizarro-Perea, M. Paz Garrastazul, G. Caballero, O. Gutierrez, G. D. Mendez, M. Gonzalez-Silva, P. Laranjeira und A. Orfao (2012). "The proliferation index of specific bone marrow cell compartments from myelodysplastic syndromes is associated with the diagnostic and patient outcome." PLoS One 7(8): e44321.
- Matthew, E. M., T. J. Yen, D. T. Dicker, J. F. Dorsey, W. Yang, A. Navaraj und W. S. El-Deiry (2007). "Replication stress, defective S-phase checkpoint and increased death in Plk2-deficient human cancer cells." Cell Cycle 6(20): 2571-8.
- Mills, K. I., A. Kohlmann, P. M. Williams, L. Wieczorek, W. M. Liu, R. Li, W. Wei, D. T. Bowen, H. Loeffler, J. M. Hernandez, W. K. Hofmann und T. Haferlach (2009). "Microarray-based classifiers and prognosis models identify subgroups with distinct

clinical outcomes and high risk of AML transformation of myelodysplastic syndrome." Blood 114(5): 1063-72.

Mross, K., C. Dittrich, W. E. Aulitzky, D. Strumberg, J. Schutte, R. M. Schmid, S. Hollerbach, M. Merger, G. Munzert, F. Fleischer und M. E. Scheulen (2012). "A randomised phase II trial of the Polo-like kinase inhibitor BI 2536 in chemo-naive patients with unresectable exocrine adenocarcinoma of the pancreas - a study within the Central European Society Anticancer Drug Research (CESAR) collaborative network." Br J Cancer 107(2): 280-6.

Muller-Tidow, C., G. Bug, M. Lubbert, A. Kramer, J. Krauter, P. Valent, D. Nachbaur, W. E. Berdel, O. G. Ottmann, H. Fritsch, G. Munzert, P. Garin-Chesa, F. Fleischer, T. Taube und H. Dohner (2013). "A randomized, open-label, phase I/II trial to investigate the maximum tolerated dose of the Polo-like kinase inhibitor BI 2536 in elderly patients with refractory/relapsed acute myeloid leukaemia." Br J Haematol 163(2): 214-22.

Münch, C., D. Dragoi, A.-V. Frey, K. Thurig, M. Lübbert, R. Wäsch, L. Bogatyreva, D. Hauschke, S. Lassmann, M. Werner und A. M. May (2015). "Therapeutic polo-like kinase 1 inhibition results in mitotic arrest and subsequent cell death of blasts in the bone marrow of AML patients and has similar effects in non-neoplastic cell lines." Leukemia Research 39(4): 462-70.

Murakami, K., H. Ueno, T. Okabe, T. Kagoo, S. Boku, T. Yano und A. Yokoyama (2017). "Bridging-to-transplant with Azacitidine for Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia, Reduces the Incidence of Acute Graft-versus-host Disease." Hematol Rep 9(2): 7114.

Nair, J. S. und G. K. Schwartz (2015). "Inhibition of polo like kinase 1 in sarcomas induces apoptosis that is dependent on Mcl-1 suppression." Cell Cycle 14(19): 3101-11.

Neef, R., U. Gruneberg, R. Kopajtich, X. Li, E. A. Nigg, H. Sillje und F. A. Barr (2007). "Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1." Nat Cell Biol 9(4): 436-44.

Neukirchen, J., W. M. Schoonen, C. Strupp, N. Gattermann, C. Aul, R. Haas und U. Germing (2011). "Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Dusseldorf MDS-registry." Leuk Res 35(12): 1591-6.

Nimer, S. D. (2008). "Myelodysplastic syndromes." Blood 111(10): 4841-51.

O'Brien, S. G., F. Guilhot, R. A. Larson, I. Gathmann, M. Baccarani, F. Cervantes, J. J. Cornelissen, T. Fischer, A. Hochhaus, T. Hughes, K. Lechner, J. L. Nielsen, P. Rousselot, J. Reiffers, G. Saglio, J. Shepherd, B. Simonsson, A. Gratwohl, J. M. Goldman, H. Kantarjian, K. Taylor, G. Verhoef, A. E. Bolton, R. Capdeville, B. J. Druker und I. Investigators (2003). "Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine

for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia." N Engl J Med 348(11): 994-1004.

Pang, W. W., J. V. Pluvineau, E. A. Price, K. Sridhar, D. A. Arber, P. L. Greenberg, S. L. Schrier, C. Y. Park und I. L. Weissman (2013). "Hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodysplastic syndromes." Proc Natl Acad Sci U S A 110(8): 3011-6.

Papaemmanuil, E., M. Cazzola, J. Boulton, L. Malcovati, P. Vyas, D. Bowen, A. Pellagatti, J. S. Wainscoat, E. Hellstrom-Lindberg, C. Gambacorti-Passerini, A. L. Godfrey, I. Rapado, A. Cvejic, R. Rance, C. McGee, P. Ellis, L. J. Mudie, P. J. Stephens, S. McLaren, C. E. Massie, P. S. Tarpey, I. Varela, S. Nik-Zainal, H. R. Davies, A. Shlien, D. Jones, K. Raine, J. Hinton, A. P. Butler, J. W. Teague, E. J. Baxter, J. Score, A. Galli, M. G. Della Porta, E. Travaglino, M. Groves, S. Tauro, N. C. Munshi, K. C. Anderson, A. El-Naggar, A. Fischer, V. Mustonen, A. J. Warren, N. C. Cross, A. R. Green, P. A. Futreal, M. R. Stratton, P. J. Campbell und C. Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome (2011). "Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts." N Engl J Med 365(15): 1384-95.

Parker, J. E., G. J. Mufti, F. Rasool, A. Mijovic, S. Devereux und A. Pagliuca (2000). "The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS." Blood 96(12): 3932-8.

Pellagatti, A., M. Cazzola, A. Giagounidis, J. Perry, L. Malcovati, M. G. Della Porta, M. Jadersten, S. Killick, A. Verma, C. J. Norbury, E. Hellstrom-Lindberg, J. S. Wainscoat und J. Boulton (2010). "Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells." Leukemia 24(4): 756-64.

Pellegrino, R., D. F. Calvisi, S. Ladu, V. Ehemann, T. Staniscia, M. Evert, F. Dombrowski, P. Schirmacher und T. Longerich (2010). "Oncogenic and tumor suppressive roles of polo-like kinases in human hepatocellular carcinoma." Hepatology 51(3): 857-68.

Petronczki, M., M. Glotzer, N. Kraut und J. M. Peters (2007). "Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle." Dev Cell 12(5): 713-25.

Pleyer, L. und R. Greil (2015). "Digging deep into "dirty" drugs - modulation of the methylation machinery." Drug Metab Rev 47(2): 252-79.

Pozdnyakova, O., P. M. Miron, G. Tang, O. Walter, A. Raza, B. Woda und S. A. Wang (2008). "Cytogenetic abnormalities in a series of 1,029 patients with primary myelodysplastic syndromes: a report from the US with a focus on some undefined single chromosomal abnormalities." Cancer 113(12): 3331-40.

Prébet, T., S. D. Gore, B. Esterni, C. Gardin, R. Itzykson, S. Thepot, F. c. Dreyfus, O. B. Rauzy, C. Recher, L. Adès, B. Quesnel, C. L. Beach, P. Fenaux und N. Vey (2011). "Outcome of high-risk myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure." J Clin Oncol 29(24): 3322-7.

Pujade-Lauraine, E., F. Selle, B. Weber, I. L. Ray-Coquard, I. Vergote, J. Sufliarsky, J. M. Del Campo, A. Lortholary, A. Lesoin, P. Follana, G. Freyer, B. Pardo, L. Vidal, B. Tholander, L. Gladieff, M. Sassi, P. Garin-Chesa, S. Nazabadioko, K. Marzin, K. Pilz und F. Joly (2016). "Volasertib Versus Chemotherapy in Platinum-Resistant or -Refractory Ovarian Cancer: A Randomized Phase II Groupe des Investigateurs Nationaux pour l'Etude des Cancers de l'Ovaire Study." J Clin Oncol 34(7): 706-13.

Raza, A. und N. Galili (2012). "The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes." Nat Rev Cancer 12(12): 849-59.

Reidel, V., J. Kauschinger, R. T. Hauch, C. Muller-Thomas, N. Nadarajah, R. Burgkart, B. Schmidt, D. Hempel, A. Jacob, J. Slotta-Huspenina, U. Hockendorf, C. Peschel, W. Kern, T. Haferlach, K. S. Gotze, S. Jilg und P. J. Jost (2018). "Selective inhibition of BCL-2 is a promising target in patients with high-risk myelodysplastic syndromes and adverse mutational profile." Oncotarget 9(25): 17270-81.

Renner, A., C. D. Santos, C. Recher, C. Bailly, L. Créancier, A. Kruczynski, B. Payrastre und S. Manenti (2009). "Polo-like kinase 1 is overexpressed in acute myeloid leukemia and its inhibition preferentially targets the proliferation of leukemic cells." Blood 114(3): 659-62.

Rollison, D. E., N. Howlader, M. T. Smith, S. S. Strom, W. D. Merritt, L. A. Ries, B. K. Edwards und A. F. List (2008). "Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs." Blood 112(1): 45-52.

Rudolph, D., M. A. Impagnatiello, C. Blaukopf, C. Sommer, D. W. Gerlich, M. Roth, U. Tontsch-Grunt, A. Wernitznig, F. Savarese, M. H. Hofmann, C. Albrecht, L. Geiselman, M. Reschke, P. Garin-Chesa, J. Zuber, J. r. Moll, G. n. R. Adolf und N. Kraut (2015). "Efficacy and Mechanism of Action of Volasertib, a Potent and Selective Inhibitor of Polo-Like Kinases, in Preclinical Models of Acute Myeloid Leukemia." American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics 352(3): 579-89.

Rudolph, D., M. Steegmaier, M. Hoffmann, M. Grauert, A. Baum, J. Quant, C. Haslinger, P. Garin-Chesa und G. R. Adolf (2009). "BI 6727, A Polo-like Kinase Inhibitor with Improved Pharmacokinetic Profile and Broad Antitumor Activity." Clin Cancer Res 15(9): 3094-102.

Schanz, J., H. Tüchler, F. Solé, M. Mallo, E. Luño, J. Cervera, I. Granada, B. Hildebrandt, M. L. Slovak, K. Ohyashiki, C. Steidl, Christa Fonatsch, M. Pfeilstöcker, T.

Nösslinger, P. Valent, A. Giagounidis, C. Aul, M. Lübbert, R. Stauder, O. Krieger, G. Garcia-Manero, S. Faderl, S. Pierce, M. M. L. Beau, J. M. Bennett, P. Greenberg, U. Germing und D. Haase (2012). "New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge." *J Clin Oncol* 30(8).

Schmucker, S. und I. Sumara (2014). "Molecular dynamics of PLK1 during mitosis." *Mol Cell Oncol* 1(2): e954507.

Schoffski, P., A. Awada, H. Dumez, T. Gil, S. Bartholomeus, P. Wolter, M. Taton, H. Fritsch, P. Glomb und G. Munzert (2012). "A phase I, dose-escalation study of the novel Polo-like kinase inhibitor volasertib (BI 6727) in patients with advanced solid tumours." *Eur J Cancer* 48(2): 179-86.

Schoffski, P., J. Y. Blay, J. De Greve, E. Brain, J. P. Machiels, J. C. Soria, S. Sleijfer, P. Wolter, I. Ray-Coquard, C. Fontaine, G. Munzert, H. Fritsch, G. Hanft, C. Aerts, J. Rapon, A. Allgeier, J. Bogaerts und D. Lacombe (2010). "Multicentric parallel phase II trial of the polo-like kinase 1 inhibitor BI 2536 in patients with advanced head and neck cancer, breast cancer, ovarian cancer, soft tissue sarcoma and melanoma. The first protocol of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Network Of Core Institutes (NOCI)." *Eur J Cancer* 46(12): 2206-15.

Scholzen, T. und J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." *J Cell Physiol* 182(3): 311-22.

Sebastian, M., M. Reck, C. F. Waller, C. Kortsik, N. Frickhofen, M. Schuler, H. Fritsch, B. Gaschler-Markefski, G. Hanft, G. Munzert und J. von Pawel (2010). "The efficacy and safety of BI 2536, a novel Plk-1 inhibitor, in patients with stage IIIB/IV non-small cell lung cancer who had relapsed after, or failed, chemotherapy: results from an open-label, randomized phase II clinical trial." *J Thorac Oncol* 5(7): 1060-7.

Servida, F., D. Soligo, L. Caneva, F. Bertolini, E. de Harven, S. Campiglio, C. Corsini und G. L. Deliliers (1996). "Functional and morphological characterization of immunomagnetically selected CD34+ hematopoietic progenitor cells." *Stem Cells* 14(4): 430-8.

Shallis, R. M., R. Ahmad und A. M. Zeidan (2018). "The genetic and molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes." *Eur J Haematol* 101(3): 260-71.

Sillibourne, J. E. und M. Bornens (2010). "Polo-like kinase 4: the odd one out of the family." *Cell Div* 5: 25.

Silverman, L. R., E. P. Demakos, B. L. Peterson, A. B. Kornblith, J. C. Holland, R. Odchimar-Reissig, R. M. Stone, D. Nelson, B. L. Powell, C. M. DeCastro, J. Ellerton, R. A. Larson, C. A. Schiffer und J. F. Holland (2002). "Randomized controlled trial of

azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B." J Clin Oncol 20(10): 2429-40.

Silverman, L. R., D. R. McKenzie, B. L. Peterson, J. F. Holland, J. T. Backstrom, C. L. Beach, R. A. Larson, Cancer und B. Leukemia Group (2006). "Further analysis of trials with azacitidine in patients with myelodysplastic syndrome: studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B." J Clin Oncol 24(24): 3895-903.

Simizu, S. und H. Osada (2000). "Mutations in the Plk gene lead to instability of Plk protein in human tumour cell lines." Nat Cell Biol 2(11): 852-4.

Sole, F., E. Luno, C. Sanzo, B. Espinet, G. F. Sanz, J. Cervera, M. J. Calasanz, J. C. Cigudosa, F. Milla, J. M. Ribera, E. Bureo, M. L. Marquez, E. Arranz und L. Florensa (2005). "Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes." Haematologica 90(9): 1168-78.

Spankuch-Schmitt, B., G. Wolf, C. Solbach, S. Loibl, R. Knecht, M. Stegmüller, G. von Minckwitz, M. Kaufmann und K. Strebhardt (2002). "Downregulation of human polo-like kinase activity by antisense oligonucleotides induces growth inhibition in cancer cells." Oncogene 21(20): 3162-71.

Stadler, W. M., D. J. Vaughn, G. Sonpavde, N. J. Vogelzang, S. T. Tagawa, D. P. Petrylak, P. Rosen, C. C. Lin, J. Mahoney, S. Modi, P. Lee, M. S. Ernstoff, W. C. Su, A. Spira, K. Pilz, R. Vinisko, C. Schloss, H. Fritsch, C. Zhao und M. A. Carducci (2014). "An open-label, single-arm, phase 2 trial of the Polo-like kinase inhibitor volasertib (BI 6727) in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer." Cancer 120(7): 976-82.

Statistisches Bundesamt (Destatis) (2017). "Todesursachen in Deutschland." Online im Internet: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>. Stand 22.09.2018.

Steehmaier, M., M. Hoffmann, A. Baum, P. Lenart, M. Petronczki, M. Krssak, U. Gurtler, P. Garin-Chesa, S. Lieb, J. Quant, M. Grauert, G. R. Adolf, N. Kraut, J. M. Peters und W. J. Rettig (2007). "BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo." Curr Biol 17(4): 316-22.

Strebhardt, K. und A. Ullrich (2006). "Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy." Nat Rev Cancer 6(4): 321-30.

Sumara, I., J. F. Gimenez-Abian, D. Gerlich, T. Hirota, C. Kraft, C. de la Torre, J. Ellenberg und J. M. Peters (2004). "Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles." Curr Biol 14(19): 1712-22.

- Sur, S., R. Pagliarini, F. Bunz, C. Rago, L. A. Diaz, Jr., K. W. Kinzler, B. Vogelstein und N. Papadopoulos (2009). "A panel of isogenic human cancer cells suggests a therapeutic approach for cancers with inactivated p53." Proc Natl Acad Sci U S A 106(10): 3964-9.
- Sutterlin, C., C. Y. Lin, Y. Feng, D. K. Ferris, R. L. Erikson und V. Malhotra (2001). "Polo-like kinase is required for the fragmentation of pericentriolar Golgi stacks during mitosis." Proc Natl Acad Sci U S A 98(16): 9128-32.
- Takahashi, T., B. Sano, T. Nagata, H. Kato, Y. Sugiyama, K. Kunieda, M. Kimura, Y. Okano und S. Saji (2003). "Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers." Cancer Sci 94(2): 148-52.
- Tefferi, A. und J. W. Vardiman (2009). "Myelodysplastic syndromes." New England Journal of Medicine 361(19): 1872-85.
- Toma, A., P. Fenaux, F. Dreyfus und C. Cordonnier (2012). "Infections in myelodysplastic syndromes." Haematologica 97(10): 1459-70.
- Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent und A. Jemal (2015). "Global cancer statistics, 2012." CA Cancer J Clin 65(2): 87-108.
- Toyama, K., K. Ohyashiki, Y. Yoshida, T. Abe, S. Asano, H. Hirai, K. Hirashima, T. Hotta, A. Kuramoto, S. Kuriya und et al. (1993). "Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan." Leukemia 7(4): 499-508.
- Valsasina, B., I. Beria, C. Alli, R. Alzani, N. Avanzi, D. Ballinari, P. Cappella, M. Caruso, A. Casolaro, A. Ciavolella, U. Cucchi, A. De Ponti, E. Felder, F. Fiorentini, A. Galvani, L. M. Gianellini, M. L. Giorgini, A. Isacchi, J. Lansen, E. Pesenti, S. Rizzi, M. Rocchetti, F. Sola und J. Moll (2012). "NMS-P937, an orally available, specific small-molecule polo-like kinase 1 inhibitor with antitumor activity in solid and hematologic malignancies." Mol Cancer Ther 11(4): 1006-16.
- Van den Bossche, J., F. Lardon, V. Deschoolmeester, I. De Pauw, J. B. Vermorken, P. Specenier, P. Pauwels, M. Peeters und A. Wouters (2016). "Spotlight on Volasertib: Preclinical and Clinical Evaluation of a Promising Plk1 Inhibitor." Med Res Rev 36(4): 749-86.
- Vardiman, J. W., J. Thiele, D. A. Arber, R. D. Brunning, M. J. Borowitz, A. Porwit, N. L. Harris, M. M. Le Beau, E. Hellstrom-Lindberg, A. Tefferi und C. D. Bloomfield (2009). "The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes." Blood 114(5): 937-51.

- Voso, M. T., G. Leone, A. Piciocchi, L. Fianchi, S. Santarone, A. Candoni, M. Criscuolo, A. Masciulli, E. Cerqui, A. Molteni, C. Finelli, M. Parma, A. Poloni, A. M. Carella, F. Spina, A. Cortelezzi, F. Salvi, E. P. Alessandrino, A. Rambaldi und S. Sica (2017). "Feasibility of allogeneic stem-cell transplantation after azacitidine bridge in higher-risk myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemia: results of the BMT-AZA prospective study." Ann Oncol 28(7): 1547-53.
- Wang, X. und R. Simon (2013). "Identification of potential synthetic lethal genes to p53 using a computational biology approach." BMC Med Genomics 6: 30.
- Warlick, E. D., A. Cioc, T. Defor, M. Dolan und D. Weisdorf (2009). "Allogeneic stem cell transplantation for adults with myelodysplastic syndromes: importance of pretransplant disease burden." Biol Blood Marrow Transplant 15(1): 30-8.
- Weichert, W., C. Denkert, M. Schmidt, V. Gekeler, G. Wolf, M. Kobel, M. Dietel und S. Hauptmann (2004). "Polo-like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma." Br J Cancer 90(4): 815-21.
- Weichert, W., G. Kristiansen, M. Schmidt, V. Gekeler, A. Noske, S. Niesporek, M. Dietel und C. Denkert (2005a). "Polo-like kinase 1 expression is a prognostic factor in human colon cancer." World J Gastroenterol 11(36): 5644-50.
- Weichert, W., G. Kristiansen, K. J. Winzer, M. Schmidt, V. Gekeler, A. Noske, B. M. Muller, S. Niesporek, M. Dietel und C. Denkert (2005b). "Polo-like kinase isoforms in breast cancer: expression patterns and prognostic implications." Virchows Arch 446(4): 442-50.
- Weichert, W., M. Schmidt, J. Jacob, V. Gekeler, J. Langrehr, P. Neuhaus, M. Bahra, C. Denkert, M. Dietel und G. Kristiansen (2005c). "Overexpression of Polo-like kinase 1 is a common and early event in pancreatic cancer." Pancreatology 5(2-3): 259-65.
- Wolf, G., R. Elez, A. Doermer, U. Holtrich, H. Ackermann, H. J. Stutte, H. M. Altmannsberger, H. Rubsamen-Waigmann und K. Strebhardt (1997). "Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer." Oncogene 14(5): 543-9.
- Woll, P. S., U. Kjällquist, O. Chowdhury, H. Doolittle, D. C. Wedge, S. Thongjuea, R. Erlandsson, M. Ngara, K. Anderson, Q. Deng, A. J. Mead, L. Stenson, A. Giustacchini, S. Duarte, E. Giannoulatou, S. Taylor, M. Karimi, C. Scharenberg, T. Mortera-Blanco, I. C. Macaulay, S.-A. Clark, I. Dybedal, D. Josefsen, P. Fenaux, P. Hokland, M. S. Holm, M. Cazzola, L. Malcovati, S. Tauro, D. Bowen, J. Boulwood, A. Pellagatti, J. E. Pimanda, A. Unnikrishnan, P. Vyas, G. Göhring, B. Schlegelberger, M. Tobiasson, G. Kvalheim, S. N. Constantinescu, C. Nerlov, L. Nilsson, P. J. Campbell, R. Sandberg, E. Papaemmanuil, E. Hellström-Lindberg, S. Linnarsson und S. E. W. Jacobsen (2014). "Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo." Cancer Cell 25(6): 794-808.

Xie, S., Q. Wang, H. Wu, J. Cogswell, L. Lu, M. Jhanwar-Uniyal und W. Dai (2001a). "Reactive oxygen species-induced phosphorylation of p53 on serine 20 is mediated in part by polo-like kinase-3." J Biol Chem 276(39): 36194-9.

Xie, S., H. Wu, Q. Wang, J. P. Cogswell, I. Husain, C. Conn, P. Stambrook, M. Jhanwar-Uniyal und W. Dai (2001b). "Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway." J Biol Chem 276(46): 43305-12.

Yang, L., Y. Zhou, Y. Li, J. Zhou, Y. Wu, Y. Cui, G. Yang und Y. Hong (2015). "Mutations of p53 and KRAS activate NF-kappaB to promote chemoresistance and tumorigenesis via dysregulation of cell cycle and suppression of apoptosis in lung cancer cells." Cancer Lett 357(2): 520-6.

Yasui, K., S. Mihara, C. Zhao, H. Okamoto, F. Saito-Ohara, A. Tomida, T. Funato, A. Yokomizo, S. Naito, I. Imoto, T. Tsuruo und J. Inazawa (2004). "Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance." Cancer Res 64(4): 1403-10.

Yoshida, K., M. Sanada, Y. Shiraishi, D. Nowak, Y. Nagata, R. Yamamoto, Y. Sato, A. Sato-Otsubo, A. Kon, M. Nagasaki, G. Chalkidis, Y. Suzuki, M. Shiosaka, R. Kawahata, T. Yamaguchi, M. Otsu, N. Obara, M. Sakata-Yanagimoto, K. Ishiyama, H. Mori, F. Nolte, W. K. Hofmann, S. Miyawaki, S. Sugano, C. Haferlach, H. P. Koefler, L. Y. Shih, T. Haferlach, S. Chiba, H. Nakauchi, S. Miyano und S. Ogawa (2011). "Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia." Nature 478(7367): 64-9.

Zitouni, S., C. Nabais, S. C. Jana, A. Guerrero und M. Bettencourt-Dias (2014). "Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions." Nat Rev Mol Cell Biol 15(7): 433-52.

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Genexpressionsanalysen der PLK-Familie in MDS und gesunden Kontrollen 40

Abbildung 2: Alter und MDS-Stadium haben keinen Einfluss auf die Proliferationskapazität der Knochenmarkszellen 42

Abbildung 3: Hemmung der *in vitro*-Proliferation von gesunden CD34⁺ Knochenmarkszellen 44

Abbildung 4: Hemmung der *in vitro*-Proliferation von CD34⁺ Knochenmarkszellen eines MDS-Patienten 44

Abbildung 5: Volasertib induziert Zelltod in CD34⁺ Knochenmarkszellen von Patienten mit MDS und sAML 46

Abbildung 6: Volasertib reduziert die Kolonienbildungskapazität drastisch 48

Abbildung 7: Niedrigdosiertes Volasertib ist nicht toxisch für gesundes Knochenmark. 51

Abbildung 8: Niedrigdosiertes Volasertib wirkt zytotoxisch auf die Stamm-/Vorläuferzelle von MDS und sAML und reduziert die Kolonienbildungsfähigkeit..... 53

Abbildung 9: Der Effekt von niedrigdosiertem Volasertib beruht sowohl auf Zelltodinduktion als auch auf Proliferationshemmung..... 55

Abbildung 10: Dosisabhängige Toxizität des selektiven PLK1-Inhibitors GSK461364A auf die gesunde Knochenmarkszelle 57

Abbildung 11: MCL-1 vermittelt Resistenz gegenüber einer Zelltodinduktion nach 72 Stunden Inhibitorbehandlung mit Volasertib 58

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: WHO-Klassifikation myelodysplastischer Syndrome von 2016 (Arber et al., 2016)	7
Tabelle 2: International Prognostic Scoring System (IPSS) für myelodysplastische Syndrome (Greenberg et al., 1997)	8
Tabelle 3: Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) für myelodysplastische Syndrome (Greenberg et al., 2012)	9
Tabelle 4: Zytogenetische Risikogruppen des IPSS-R (Schanz et al., 2012)	10
Tabelle 5: WHO Classification-based Prognostic Scoring System (Malcovati et al., 2007)	11
Tabelle 6: Verwendete Geräte	21
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und biogene Substanzen.....	22
Tabelle 8: Verwendete Standardlösungen und Puffer	23
Tabelle 9: Verwendete Zellkulturmedien und Medienzusätze.....	24
Tabelle 10: Verwendete Antikörper, Inhibitoren und Kits	25
Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 12: Verwendetes Werkzeug	26
Tabelle 13: Verwendete Software	27
Tabelle 14: Klinische Annotation des Patientenkollektivs	36
Tabelle 15: Altersverteilung von Patienten- und Kontrollkollektiv	38

10 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen ganz besonders bedanken, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. med. Philipp Jost

für die Ermöglichung meiner Dissertation in der III. Medizinischen Klinik für Hämatologie und internistische Onkologie des Klinikums rechts der Isar und für die Schaffung von optimalen Arbeitsbedingungen,

Dr. med. Stefanie Jilg

für die intensive Betreuung, die tatkräftige Unterstützung und das offene Ohr bei allen Problemen,

Ulrike Höckendorf

für die außerordentliche fachliche Unterstützung (insbesondere bei Komplikationen am Durchflusszytometer) und das inoffizielle Mentoring,

Veronika Dill

für die Einarbeitung ins Labor, die hervorragende Zusammenarbeit und die daraus entstandene Freundschaft,

allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Jost

für die kollegiale Zusammenarbeit und die Unterstützung bei allen Problemen des Laboralltags,

meiner Familie und insbesondere meiner Mutter Anita Kauschinger

für die bedingungslose und großzügige Förderung während Schule, Studium und Promotion.