

Fakultät für Medizin

---

Untersuchung zur Überwindung der Stromaresistenz von FLT-3 ITD + AML Zellen durch die Kombination von Crenolanib und Azacitidin

---

Saskia Heidemarie Wolf

---

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Weber

Prüfende/-r der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Katharina S. Götze

---

2. Prof. Dr. Dieter Saur

---

Die Dissertation wurde am 30.11.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2021 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Die physiologische Hämatopoese . . . . .	5
1.1.1	Die adulte Hämatopoese und die hämatopoetische Stammzelle . .	5
1.2	Stammzellnische . . . . .	6
1.2.1	El08 in vitro . . . . .	7
1.3	Akute myeloische Leukämie . . . . .	7
1.3.1	Allgemeines . . . . .	7
1.3.2	Pathophysiologie der AML . . . . .	7
1.3.3	WHO Klassifikation 2016 . . . . .	7
1.3.4	Prognose . . . . .	9
1.3.5	Diagnostik . . . . .	10
1.3.6	Bisherige Therapie der AML . . . . .	10
1.4	Entstehung der FLT3 ITD+ AML . . . . .	12
1.5	Aufbau des FMS-like Tyrosinkinase 3 (FLT3) Rezeptors und dessen nachgeschalteten Signalweg . . . . .	13
1.5.1	Aufbau und Aktivierung des FLT3-Gens und -Rezeptors . . . . .	13
1.5.2	Aufbau des FLT3-Signalwegs sowie dessen Funktion . . . . .	15
1.6	Crenolanib und Azacitidin . . . . .	16
1.6.1	Tyrosinkinaseinhibitoren am Beispiel von Crenolanib . . . . .	16
1.6.2	Das Cytosinanaloga Azacitidin . . . . .	17
1.6.3	Rationale für die Kombinationstherapie mit Crenolanib und Azacitidin . . . . .	18
1.7	Migration und CxCr4 . . . . .	19
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>21</b>
3.1	Verwendete Zelllinien . . . . .	21
3.1.1	Suspensionszelllinien . . . . .	21
3.1.2	Adhärenente Zelllinien . . . . .	21
3.1.3	AML Patientenproben . . . . .	21
3.2	Medikamente . . . . .	22
3.3	Chemikalien . . . . .	22
3.4	Geräte . . . . .	24
3.5	Antikörper . . . . .	25
3.5.1	Primäre Antikörper . . . . .	25
3.5.2	Sekundäre Antikörper . . . . .	26
3.5.3	FACS Antikörper . . . . .	26
3.6	Software . . . . .	26
3.7	Standardlösungen und -puffer . . . . .	27
3.7.1	Amido black stain . . . . .	27
3.7.2	Annexin/Pi Puffer . . . . .	27
3.7.3	HEF2+ Puffer . . . . .	27
3.7.4	1x Lysis Puffer . . . . .	28
3.7.5	5x Lysis Puffer . . . . .	28
3.7.6	2x Protein-Loading Buffer (LB) . . . . .	29
3.7.7	10x Running-Buffer . . . . .	29
3.7.8	10x TBS . . . . .	29
3.7.9	Transferpuffer . . . . .	30

3.7.10	BaF3-Medien . . . . .	30
3.7.11	Stroma-Medium . . . . .	30
3.7.12	Freeze-Medium . . . . .	31
3.7.13	Gelatine 0.1% . . . . .	31
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
4.1	Allgemeine Zellkultur . . . . .	32
4.1.1	Kultivierung von Zelllinien . . . . .	32
4.1.2	Bestimmung der Zellzahl . . . . .	32
4.1.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien . . . . .	32
4.1.4	Extraktion mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation . . . . .	33
4.2	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	33
4.2.1	Erzeugen von Zelllysaten . . . . .	33
4.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels DC Protein Assay . . . . .	33
4.2.3	Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) . . . . .	33
4.2.4	Immunchemischer Nachweis von Proteinen . . . . .	34
4.2.5	FACS . . . . .	34
4.2.5.1	Messung von Oberflächenproteinen . . . . .	35
4.2.5.2	Annexin/Pi (Messung von Apoptose) . . . . .	35
4.2.5.3	BrDU (Zellzyklusanalyse) . . . . .	35
4.3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	36
4.3.1	MTT Assay . . . . .	36
4.3.2	Migrationsassay . . . . .	36
4.4	Statistik . . . . .	36
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
5.1	Charakterisierung der BaF3 Zellen . . . . .	37
5.2	Wirkung von Crenolanib auf BaF3 Zellen . . . . .	38
5.3	Zytotoxische Wirkung von Azacitidin auf BaF3-Zellen . . . . .	41
5.4	Stromakontakt führt zum Proliferationsstop von FLT3-ITD- und FLT3-WT transfizierten BaF3-Zellen . . . . .	42
5.5	Wirkung der Kombination von Crenolanib und Azacitidin auf BaF3-WT- und -ITD-Zellen . . . . .	43
5.6	Wirkung von Crenolanib und Azacitidin auf den Zellzyklus . . . . .	47
5.7	CxCr4 Expression der BaF3-Zellen . . . . .	49
5.8	Migration der BaF3-Zellen . . . . .	50
5.9	Wirkung von Crenolanib auf den FLT-3 Signalweg in Primärmaterial . . . . .	51
5.10	Wirkung von Crenolanib und Azacitidin auf CxCr4 in Primärmaterial . . . . .	52
5.11	Migration von CD34/CD38- Zellen aus Primärmaterial . . . . .	53
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>68</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>69</b>

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
Ak	Antikörper
Akt	AKT serine/threonine kinase 1
AML	Akute myeloische Leukämie
AZA	Azacitidin
BaF3	murine pro-B-Zelllinie
BrDU	Bromodeoxyuridine
BSA	Boverine serum Albumine
Creno	Crenolanib
CxCr4	C-X-C chemokine rezeptor 4
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuclease I
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Erk	Extracellular-signal-regulated kinases
FACS	Fluoresc activated cell sorte
FCS	Fetales Kälberserum
Fitc	Fluoresceinisothiocyanat
FLT3	FMS-like Tyrosinkinase 3
G1; S; G2/M	Phasen des Zellzyklus
GFP	Green fluorescent protein
HBSS	Hanks buffered salt solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazine)9-ethansulfonsäure
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
H <sub>2</sub> O	Wasser
IgG	Immunglobulin G
IL-3	Interleukin 3

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ITD	Interne Tandemduplikation
L	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LSC	Leukämische Stammzelle
mA	Milli-Ampere
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin
pH	Negativer, dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Pi	Prodiimid
PIG	Puromycin-IRES-GFP-Vektor
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
SDF1	Stromal-derived factor-1
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WHO	World health organization
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

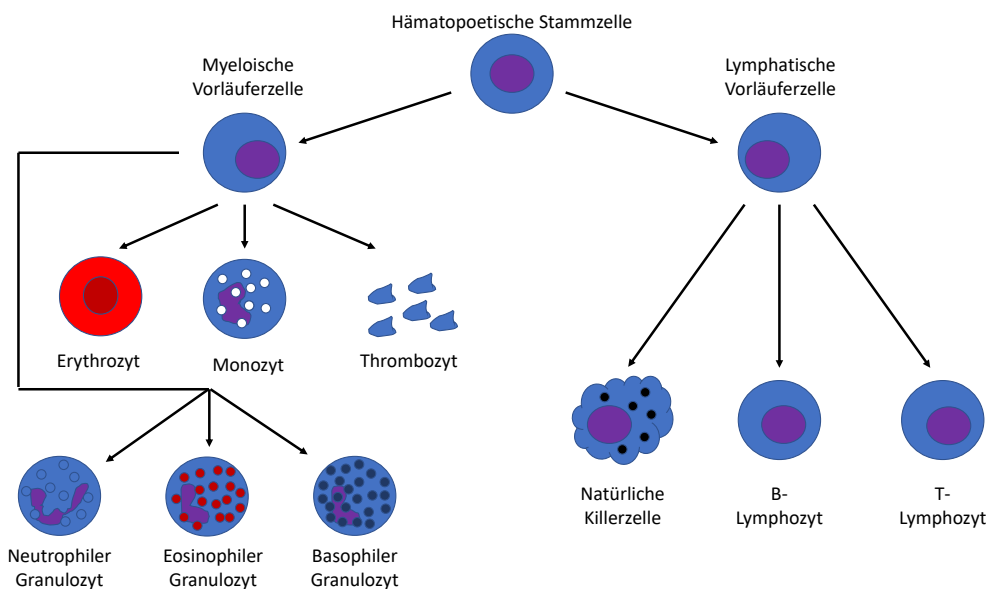
## 1.1 Die physiologische Hämatopoese

Hämatopoese bezeichnet den Prozess der Ausreifung von Stammzellen, über Vorläuferzellen, zu den unterschiedlichen ausgereiften Blutzellen. Dabei führt das Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren zur Expression von Genen, welche die Proliferation und Differenzierung steuern. (Grafone et al. 2012)

Insgesamt produziert der menschliche Körper drei Gruppen verschiedener Blutzellen. Die Erythrozyten, welche für den Transport von Gasen in unserem Blut verantwortlich sind; die Thrombozyten, welche eine wichtige Rolle in der Blutgerinnung spielen sowie die Leukozyten, die einen wesentlichen Bestandteil unserer Immunabwehr darstellen. (Weiss 1997)

### 1.1.1 Die adulte Hämatopoese und die hämatopoetische Stammzelle

Die Bildung der verschiedenen Blutzellen erfolgt aus den hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Hierunter versteht man Zellen, welche die Eigenschaft besitzen sich mit sehr hoher Effektivität in alle Zelllinien des Blutes differenzieren zu können. (Spangrude et al. 1988) Zudem besitzen alle Stammzellen die Fähigkeit der Selbsterneuerung und somit die Möglichkeit, auch auf Dauer, für eine ausreichende Anzahl an Stammzellen zu sorgen. (Spangrude et al. 1991)



**Abbildung 1: Die physiologische Hämatopoese** aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (modifiziert nach dem Kompetenznetz Leukämien)

Kommt es zum Ungleichgewicht in einer oder mehrerer dieser Zellreihen, kann dies verheerende Auswirkungen auf das sensible Gleichgewicht der Blutzellen haben und somit zu verschiedenen Krankheiten führen.

## 1.2 Stammzellnische

Die Stammzellnische bezeichnet ein Mikroenvironment, welches in engem Kontakt mit den Stammzellen steht und diese in ihrer Funktion unterstützt sowie eine Schutzfunktion ausübt. (Fuchs et al. 2004)

Zudem können sich die Stammzellen in dieser Umgebung selbst erneuern ohne dabei zu differenzieren. (Wilson und Trumpp 2006)

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden in wieweit dieser Schutz, welcher nicht nur die hämatopoetischen sondern auch die leukämischen Stammzellen schützt, durch die Wirkstoffkombination von Crenolanib und Azacitidin überwunden werden kann. Diese Arbeit ist dabei Teil eines Projekts, welches sich mit der FLT3-ITD positiven Stammzelle und dem Einfluss der Nische auf diese beschäftigt.

Geschützt von der Nische findet die adulte Hämatopoese im Knochenmark statt, während die fetale Hämatopoese in der Leber abläuft. Die Stammzellen siedeln sich hierfür in der endostalen oder in der vaskulären Nische an. Unter der endostalen Nische versteht man hierbei die Auskleidung der Knochenmarkshöhle, während die vaskuläre Nische das Endothel der Sinuside beschreibt.

Die endostale Nische zeichnet sich zudem insbesondere durch spezialisierte Osteoblasten aus, welche in direkter Wechselwirkung mit den hämatopoetischen Stammzellen stehen. (Wilson und Trumpp 2006)

Innerhalb der Nische üben verschiedene Zellarten einen Effekt auf die Stammzellen aus.

So führt eine Zunahme an spindelförmigen N-Cadherin + CD45-Osteoblasten (SNO), eine Zellart der hämatopoetischen Nische, wahrscheinlich auch zu einer Zunahme der HSCs (Zhang et al. 2003). Dieser Zusammenhang wird in aktuellen Studien jedoch noch kritisch hinterfragt.

Betrachtet man den Aufbau des Knochenmarks kann davon ausgegangen werden, dass sich die verschieden weit differenzierten Stammzellen an spezifischen Orten des Knochens bzw. des Knochenmarks ansiedeln. So konnten Nilsson et al. 2001 zeigen, dass sich HSC häufig im Endosteum anreichern, wohingegen differenzierte Zellen eher in zentralen Knochenmarksregionen zu finden sind. (Nilsson et al. 2001)

Zudem konnte gezeigt werden, dass viele hämatopoetische Stammzellen mit dem diskontinuierlichen Endothel von Leber und Knochenmark assoziiert sind. (Kiel et al. 2005)

### **1.2.1 EI08 in vitro**

Um das Mikroenvironment der Nische auch in unseren Versuchen zu berücksichtigen, muss dies in vitro nachgestellt werden. Dies gelingt durch den Einsatz der Zelllinie EI08. Hierbei handelt es sich um eine homogene Zelllinie, welche aus einer embryonalen Mausleber gewonnen wurde. Sie sind vielfach passagierbar und behalten dabei ihre Eigenschaften bei. In früheren Studien konnte für die EI08-Zellen zudem eine unterstützende Funktion von HSCs im Colony-Forming-Cell-Assay nachgewiesen werden.

EI08-Zellen sind für diese Arbeit besonders geeignet, da die Zellen keine FL- bzw. Flk-2 Oberflächenmoleküle tragen und somit keine Verfälschungen der Ergebnisse zu erwarten sind. Außerdem unterliegen sie, anders als primäre Zellen, keinen Schwankungen durch individuelle Eigenschaften. (Oostendorp et al. 2002c)

## **1.3 Akute myeloische Leukämie**

### **1.3.1 Allgemeines**

Die Leukämie ist eine eher seltene Krebserkrankung des Erwachsenenalters. Sie macht etwa 2,4% der Tumorerkrankungen aus.

Ca. 10% der Betroffenen erkranken an der chronischen Verlaufsform der myeloische Leukämie.

Die restlichen Neuerkrankungen verteilen sich auf die akute lymphatische Leukämie sowie die akute myeloische Leukämie, welche in dieser Arbeit näher untersucht werden soll. (nach der deutschen Krebsgesellschaft) Kennzeichnend für diese ist unter anderem der normalerweise sehr rasche Symptombeginn innerhalb von wenigen Wochen. (Khwaja et al. 2016)

### **1.3.2 Pathophysiologie der AML**

Unter der AML versteht man eine maligne Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen, welche durch ein abnormales Zellwachstum, Zellüberleben sowie eine unzureichende Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen gekennzeichnet ist.

Diese Veränderungen werden durch verschiedene epigenetische, zytogenetische sowie spezifische Mutationen ausgelöst. (Khwaja et al. 2016)

Diese können entweder im Rahmen einer vorangegangenen myeloischen Erkrankung, nach leukämogener Therapie oder de novo entstehen. (Lindsley et al. 2015)

### **1.3.3 WHO Klassifikation 2016**

Durch die WHO ist auf Grund der unterschiedlichen zugrundeliegenden Mutationen und Ursachen eine Einteilung in verschiedene AML Subtypen erfolgt. Hier wird zwischen verschiedenen genetischen Varianten, Therapie-assoziierten Erkrankungen und der nicht weiter spezifizierten akuten myeloischen Leukämie unterschieden.



## **Kategorien**

---

### **AML mit wiederkehrenden genetischen Abnormalitäten**

- AML mit t(8;21)(q22;q22.1),RUNX1-RUNX1T1
- AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
- Akute Promyelozyten Leukämie mit PML-RARA\*
- AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
- AML mit t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
- AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM(EVI1)
- AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); RPM15-MKL1
- vorläufige Entität: AML mit BCR-ABL1
- AML mit mutiertem NPM1
- AML mit biallelischer Mutation von CEBPA
- vorläufige Entität: AML mit mutiertem RUNX1

### **AML mit myelodisplastisch-bezogenen Veränderungen**

#### **Therapie-assoziierte myeloide Neoplasie**

#### **AML, nicht weiter spezifiziert (NOS)**

- AML mit minimaler Differenzierung
- AML ohne Ausreifung
- AML mit Ausreifung
- Akute myelomonozytische Leukämie
- Akute monoblastische/monozytische Leukämie
- Akute erythroide Leukämie
- Akute megakaryoblastische Leukämie
- Akute basophile Leukämie
- Akute Panmyelose mit Myelofibrose

#### **Myeloides Sarkom**

#### **Down Syndrom assoziierte myeloide Proliferation**

- Transiente abnormale Myelopoese
- Down Syndrom assoziierte myeloide Leukämie

#### **Blastische plasmazytoide dendritische Zellneoplasie**

#### **Akute Leukämie unbekannter Abstammung**

- Akute undifferenzierte Leukämie
- MPAL mit t(9;22)(q34.1; q11.2); BCR-ABL1
- MPAL mit t(v;11q23.3); KMT2A reorganisiert
- MPAL, B/myeloid, NOS
- MPAL, T/myeloid, NOS

---

**Tabelle 1:** WHO Klassifikation 2016 (Döhner et al. 2017)

### 1.3.4 Prognose

Die Prognose eines an AML erkrankten Patienten lässt sich, unter Abwägung verschiedener Risikofaktoren, gut einschätzen. Hierfür werden eine Vielzahl unterschiedlicher prognostischer Faktoren herangezogen, welche in Zusammenschau ausschlaggebend für die individuelle Prognose sind. Diese Faktoren lassen sich nach Döhner et al. in verschiedene Unterkategorien einteilen.

Hierzu zählen zum einen patientenbezogene Faktoren wie Alter, genereller Gesundheitszustand, frühere Behandlungen mit Chemotherapeutika sowie das Vorliegen anderer hämatologischer Grunderkrankungen, wie zum Beispiel des myelodysplastischen Syndroms.

Zum anderen spielen krankheitsbezogene Faktoren eine wichtige Rolle. Hierunter fallen insbesondere genetische Mutationen und Chromosomenaberrationen, welche Einfluss auf die Prognose nehmen können. (Döhner et al. 2017) Diese bedingen zum einen eine unterschiedliche Aggressivität der Erkrankung, zum anderen bieten sich teils unterschiedliche Therapiemöglichkeiten.

#### **Risikokategorien**

---

##### **Günstig**

t(8;21)(q22;q22.1), RUNX1-RUNX1T1  
inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11  
Mutiertes NPM1 ohne FLT3-ITD oder mit FLT3-ITD(low)  
Biallelische Mutation von CEBPA

##### **Intermediär**

Mutiertes NPM1 und FLT3-ITD (high)  
Wildtyp NPM1 ohne FLT3-ITD oder mit FLT3-ITD(low)  
t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A  
Zytogenetische Abnormalität die nicht als günstig oder nachteilig klassifiziert sind

##### **Nachteilig**

t(6;9)(p23; q34.1), DEK-NUP214  
t(v;11q23.3); KMT2A reorganisiert  
t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1  
inv(3)(q21.3q26.6.) or t(3;3)(q21.3;q26.2), GATA2, MECOM(EV1)  
-5 oder del(5q); -7;-17/abn(17p)  
Komplexer Karyotyp; Monosomaler Karyotyp  
Wildtyp NPM1 und FLT3-ITD(high)  
Mutiertes RUNX1  
Mutiertes ASXL1  
Mutiertes TP53

---

**Tabelle 2:** ELN Risikoklassifikation 2017 (Döhner et al. 2017)

Aufgrund der unterschiedlichen prognostischen Bedeutung einzelner Mutationen sowie von zytogenetischen Veränderungen kommt das European LeukemiaNet in ihrer Einschätzung von 2017 zu einer Unterteilung der verschiedenen genetischen Varianten in insgesamt 3 Unterkategorien (Tabelle 2). Die in dieser Arbeit untersuchte Mutation des FLT3-Gens wird dabei in Abhängigkeit von Co-Mutationen einer intermediären bzw. schlechten Prognose zugeordnet. (Döhner et al. 2017)

Insgesamt weist die AML im Erwachsenenalter eine eher schlechte Prognose auf.

### **1.3.5 Diagnostik**

Für die Diagnosestellung der AML sind eine Vielzahl verschiedener diagnostischer Methoden notwendig. (Döhner et al. 2017)

Den ersten Schritt stellt immer die Auswertung eines Blutbilds sowie eines Differentialblutbildes dar. Zudem sollte ein Gerinnungs-Labor sowie die Elektrolyte bestimmt werden. Weiterhin erfolgt die Messung von Leber- und Nierenwerten sowie der LDH. (Weinberg et. al. 2017)

Im Anschluss erfolgt die Untersuchung der Zellmorphologie im Blut- bzw. Knochenmarksausstrich sowie die Bestimmung des prozentualen Blastenanteils.

Für die Diagnose der akuten Leukämie ist eine Mindestzahl von 200 Leukozyten im Blutausstrich sowie der Nachweis von mindestens 500 kernhaltigen Zellen im Knochenmarksausstrich notwendig. Außerdem wird für fast alle AML-Subtypen ein Blastenanteil von  $\geq 20\%$  im Knochenmark gefordert. (Döhner et al. 2017)

Zudem sollte eine zytogenetische- sowie molekularzytogenetische Untersuchung durchgeführt werden. Durch eine Immunphenotypisierung kann eine weitere Einteilung der akuten myeloischen Leukämie erfolgen.

Aufgrund der hohen Bedeutung für die Prognose, aber insbesondere auch für die Anwendung spezifischer Therapieverfahren, sollte im Anschluss immer eine Untersuchung auf molekulargenetische Veränderungen angeschlossen werden. Die wichtigsten Mutationen, auf die hierbei getestet wird, sind Mutationen in den Genen FLT3 (ITD), RUNX1, CEBPA sowie NPM1. (Creutzig et al. 2012)

Wenn möglich, sollte vor Therapiebeginn eine Asservierung von Blut- und Knochenmarksproben in Biobanken erfolgen. (Döhner et al. 2017)

### **1.3.6 Bisherige Therapie der AML**

Zurzeit stehen in der Behandlung der AML drei Haupttherapiearme zur Verfügung. Diese sind eine alleinige Chemotherapie, eine Chemotherapie in Kombination mit einer anschließenden allogenen oder autologen Stammzelltransplantation und, in besonderen

Fällen, die Verwendung von Biologika. Die zur Verfügung stehenden Therapieoptionen haben sich hierbei, mit Ausnahme der relativ neuen Biologika, in den letzten Jahrzehnten kaum verändert. (Döhner et al. 2017)

Die Standardtherapie der AML stellt auch heute noch die alleinige Chemotherapie dar.

Diese wird, soweit es der Gesundheitszustand des Patienten zulässt, zunächst mit einer Induktionsphase begonnen. Diese hat zum Ziel, eine komplette Remission zu erreichen. (Schaich et al. 2011)

Die Standardinduktionsphase beinhaltet dabei in der Regel eine Therapie mit einem Anthrazyklin (z.B. Daunorubicin oder Idarubicin) für 3 Tage und Cytarabin für 7-10 Tage. Mit diesem Therapieschema kann, bei unter 60-jährigen, zu über 85% eine komplette Remission erreicht werden. (Creutzig et al. 2012)

Von einer kompletten Remission spricht man, wenn folgende Kriterien erfüllt sind. Im peripheren Blutaussstrich dürfen keine Blasten mehr sichtbar sein und zudem müssen im Blut mindestens  $1,5 \times 10^9/L$  neutrophile Granulozyten sowie mindestens  $100 \times 10^9/L$  Thrombozyten nachweisbar sein.

Das Knochenmarkspunktat muss zudem weniger als 5% Blasten aufweisen. Außerdem darf es keine Anzeichen für das Vorliegen einer extramedullären Leukämie geben. Hierunter würde zum Beispiel der Befall des zentralen Nervensystems fallen. (Cheson et al. 1990)

Nach Erreichen der kompletten Remission schließt sich die Postremissionstherapie, auch Konsolidierung, an. Sie besteht entweder aus einer weiteren alleinigen Chemotherapie oder mehreren Zyklen Chemotherapie mit Cytarabin in Kombination mit einer autologen oder allogenen Stammzelltransplantation. (Döhner et al. 2017)

Die konventionelle Konsolidierung beinhaltet dabei in der Regel eine Therapie mit bis zu 4 Zyklen hochdosiertem Cytarabin. (Döhner et al. 2017)

Wird zudem eine Stammzelltransplantation durchgeführt, wird zwischen der allogenen und der autologen Stammzelltransplantation unterschieden. In der Therapie der AML wird dabei die allogene Stammzelltransplantation bevorzugt. (Cornelissen et al. 2016)  
Darunter versteht man die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen eines Fremdspenders. (Steinberg et al. 2015)

Vellenga et al. zeigten, dass die Patienten, die eine Stammzelltransplantation erhalten hatten, gegenüber Patienten, welche mit einer alleinigen Chemotherapie behandelt wurden, ein besseres Rezidivverhalten aufweisen. Das Langzeitüberleben war in dieser Studie

jedoch vergleichbar. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass Patienten mit einem Rezidiv und bisher alleiniger Chemotherapie noch weitere Therapiemaßnahmen inklusive der Stammzelltransplantation zur Verfügung haben. (Vellenga et al. 2011)

Aber insbesondere für Patienten mit schlechter bis sehr schlechter Risikoprognose stellt die allogene Stammzelltransplantation die zu präferierende Postremissionstherapie dar. (Cornelissen et al. 2016)

In den letzten Jahren finden außerdem immer mehr unterstützende Substanzen und Biologika Anwendung in der Therapie der AML. Dazu gehören unter anderem verschiedene Tyrosinkinaseinhibitoren, wie die FLT3-Inhibitoren Crenolanib und Sorafenib, und das Nukleosidanaloga Azacitidin. Außerdem sind zurzeit verschiedene monoklonale Antikörper Bestandteil von Therapiestudien. (Döhner et al. 2017)

## **1.4 Entstehung der FLT3 ITD+ AML**

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf einer speziellen Unterform der akuten myeloischen Leukämie, welche eine Mutation im FLT3-Gen aufweist.

1971 untersuchte Alfred Knudson die Entstehung von Retinoblastomen (Knudson 1971) und formulierte auf Grundlage dieser Ergebnisse die two-hit Hypothese der Tumorgenese. (Hino und Kobayashi 2017)

Auch die Entstehung der FLT3 ITD+ AML verläuft wahrscheinlich nach dem two-hit-Model. Hierbei wird davon ausgegangen, dass es zu mindestens zwei Mutationen in Genen der normalen Hämatopoese kommt und hämatopoetische Stammzellen dadurch maligne verändert werden. (Gilliland und Griffin, 2002) Die Mutationen treten dabei in der frühen Hämatopoese, in den HSCs und frühen Progenitorzellen auf. Hierdurch finden sie sich in allen daraus entstehenden Blutzellen.

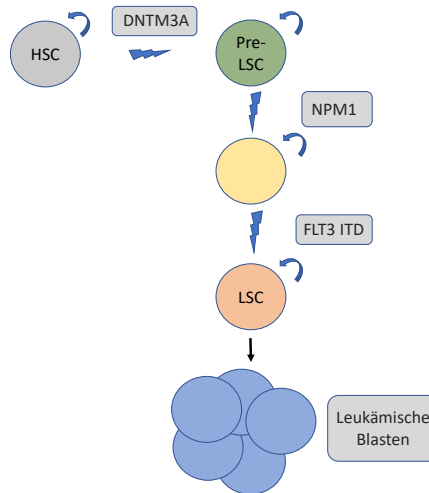
Im Speziellen bedeutet dies, dass sowohl Proliferationssignale betroffen sein müssen und es zudem zu einem Differenzierungsblock in den Zellen kommt.

Es wird hier zwischen Mutationen der Klasse I, welche einen proliferativen Effekt haben und Mutationen der Klasse II, welche die Differenzierung einschränken, unterschieden. Gene der ersten Kategorie sind c-KIT, FLT3 sowie RAS während zu den Mutationen der Klasse II die Inversion *inv(16)* sowie das CBFbeta-MYH11 Fusionsgen gehören. (Reilly 2005)

Die meisten AML-Erkrankten weisen im Schnitt jedoch 4-9 Mutationen auf.

Zudem werden häufig Mutationen im DNTM3A- sowie im NPM1-Gen beschrieben. Insbesondere diese beiden Mutationen in Kombination mit einer Mutation des FLT3 Gens weisen eine besonders schlechte Prognose auf. (Papaemmanuil et al. 2016)

Für die Entstehung der AML sind also verschiedene Mutationen verantwortlich.



**Abbildung 2: Model der Entstehung einer FLT3 ITD+ AML** Mutationen, in der epigenetischen Regulation, können dafür verantwortlich sein, dass aus einer hämatopoetischen Stammzelle (HSC) eine pre-leukämische Stammzelle entsteht. Diese können sich weiterhin vermehren und in physiologische Blutzellen entwickeln und sind daher klinisch unauffällig. Das Auftreten weiterer Mutationen, zum Beispiel im FLT3-Gen können dann jedoch zur Entstehung einer leukämischen Stammzelle führen. Die so veränderten Stammzellen beginnen sich unkontrolliert zu proliferieren und eine Vielzahl unreifer myeloider Blasten zu bilden. (nach Garz, 2017c).

## 1.5 Aufbau des FMS-like Tyrosinkinase 3 (FLT3) Rezeptors und dessen nachgeschalteten Signalweg

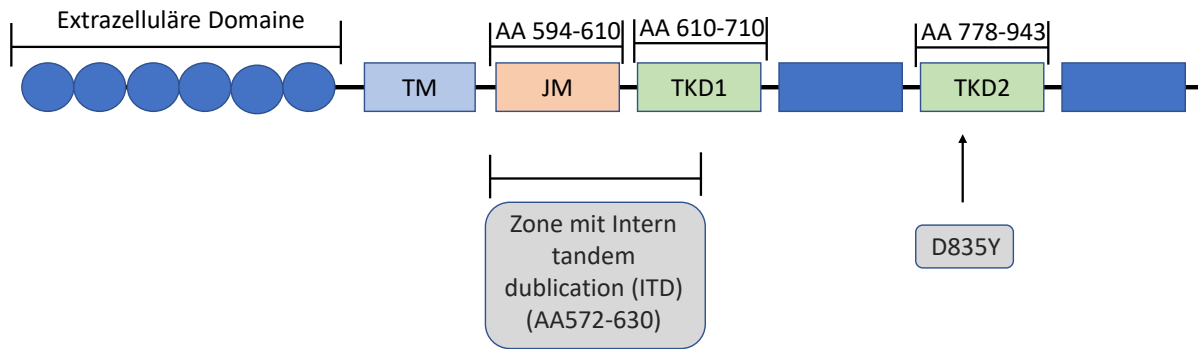
### 1.5.1 Aufbau und Aktivierung des FLT3-Gens und -Rezeptors

Tyrosinkinase-Rezeptoren sind Transmembranrezeptoren, also Rezeptoren welche eine transmembranen Domain aufweisen. Die Aktivierung dieser Rezeptoren erfolgt über das Binden eines Liganden, welcher eine Dimerisierung des Rezeptors und im Anschluss die Autophosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils auslöst. (Hubbard 1999)

Bei dem dabei phosphorylierten Bereich handelt es sich um eine Polypeptidregion außerhalb des aktiven Zentrums - dem sogenannten activation loop. (Adams 2003)

Auch bei FLT3 handelt es sich um einen Tyrosinkinase-Rezeptor, welcher in der Zellmembran von Zellen der myeloiden sowie B-lymphoiden Zelllinie beschrieben wurde. (Rosnet et al. 1996b) Außerdem tritt er auf Zellen der Placenta, den Gonaden sowie im Gehirn auf. (Rosnet et al. 1991)

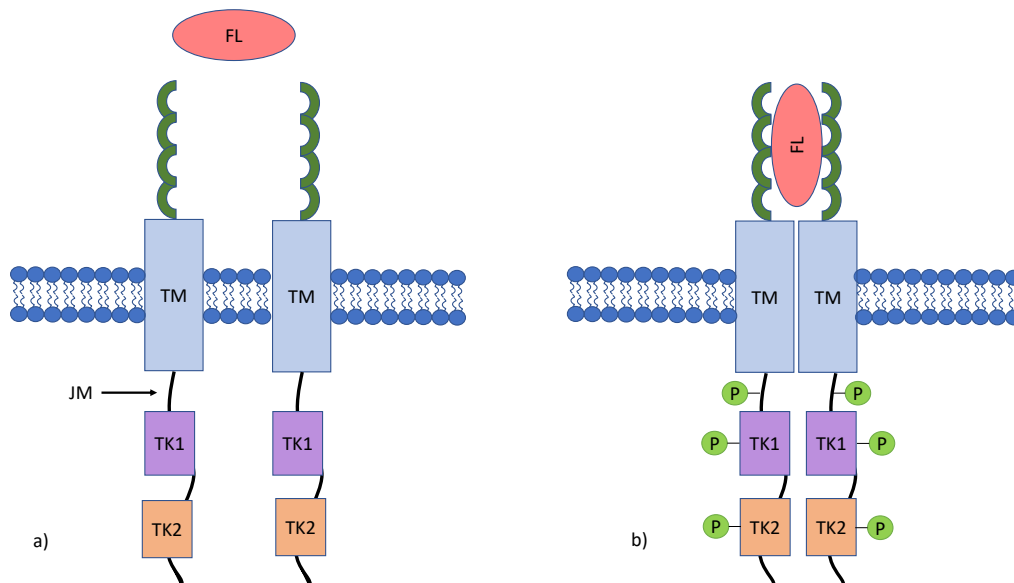
Ca. 30% aller Patienten mit AML weisen eine Mutation im FLT3 Gen auf. Dabei sind Intern Tandem Mutationen mit 24% deutlich häufiger als Mutationen im activation loop. (Gilliland und Griffin, 2002)



**Abbildung 3: Aufbau des FLT3 Gens mit häufigen Mutationloci** Interne Tandemmutationen befinden sich im Bereich der juxtamembranösen Domain bzw. in der Tyrosinkinase Domain 1. (nach Janke et al. 2014)

Zusätzlich lassen sich die Mutationen des FLT3-Gens im Bezug auf ihre Lokalisation innerhalb oder außerhalb der juxtamembranösen Domain beschreiben. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass beide Lokalisationen zur Ausbildung einer myeloproliferativen Erkrankung führen. (Breitenbuecher et al. 2009)

Die in dieser Arbeit untersuchten Intern Tandem Mutationen finden sich in der juxtamembranösen- sowie in der TK1-Domain. (Nakao et al. 2000, Kelly et al. 2002d)



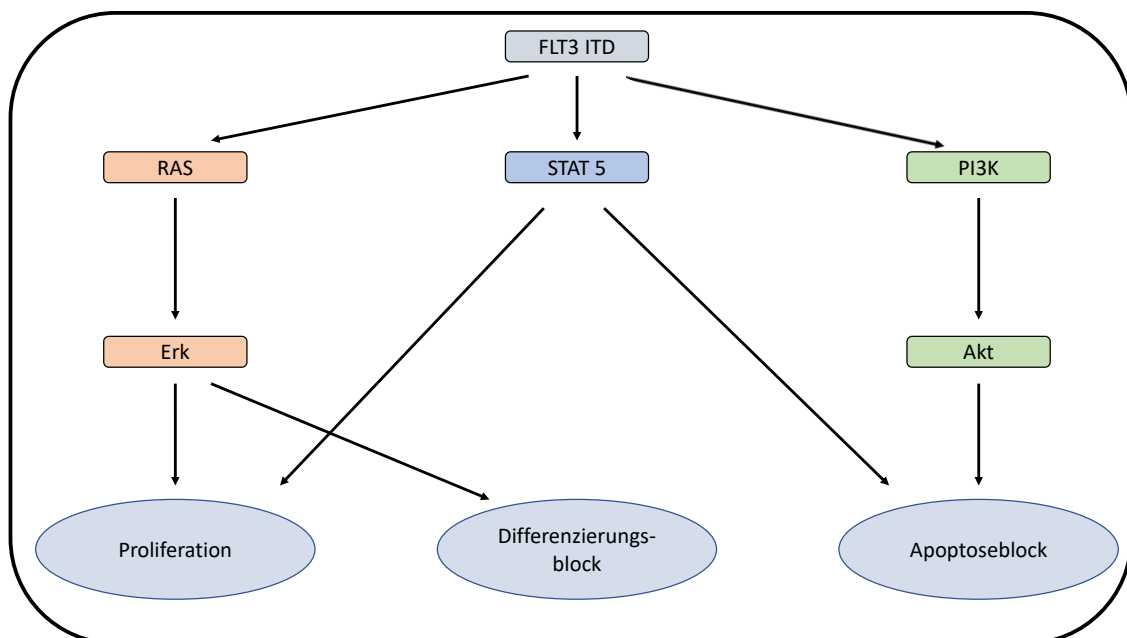
**Abbildung 4: Aufbau des FLT3 Rezeptors. a) inaktive Form, b) durch den FLT3 Liganden (FL) aktivierte Form.** Der FLT3-Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Domäne, welche für die Bindung des FL-Liganden verantwortlich ist; der transmembranösen Domain (TM), welche den Rezeptor in der Plasmamembran verankert; der juxtamembranösen Domain (JM), in welcher viele der für die FLT3 ITD+ AML typische Mutationen sitzen sowie zwei Tyrosinkinase-Domains (TK1 und TK2). Kommt es zur Bindung des FL-Liganden führt eine Konformationsänderung des Rezeptors zu dessen Aktivierung. (Nach Grafone et al. 2012)

Der FLT3-Rezeptor wird durch den FL-Ligand aktiviert. Bei diesem handelt es sich um ein kleines Molekül aus der Familie der Wachstumsfaktoren. (Lyman 1995)

Nach der Aktivierung des FLT3-Rezeptors kommt es zu einer verstärkten Proliferation der hämatopoetischen Zellen sowie einer erleichterten Mobilisierung der hämatopoetischen Stammzellen. (Fukuda et al 2005)

Mutationen innerhalb des FLT3-Gens bedingen eine konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors sowie der nachgeschalteten Signalwege. Dies führt zu einer verminderten Apoptose der betroffenen Zellen. (Ballaschk 2014) Zudem täuscht die FLT3-ITD Mutation eine Aktivierung durch IL3 vor. Die so aktivierten Gene führen zu einem vermehrten Zellwachstum sowie einer gesteigerten Proliferation. Auch einige Zielgene des STAT-Signalwegs werden durch die ITD-Mutation aktiviert. (Mizuki et al. 2003)

### 1.5.2 Aufbau des FLT3-Signalwegs sowie dessen Funktion



**Abbildung 5: Darstellung des FLT3 Signalwegs und die über die Modulation von STAT5, Akt und Erk gesteuerten Funktionen der Zelle**

Spiekermann et al. untersuchten den Effekt der FLT3-Mutation und somit einer dauerhaften Aktivierung des FLT3-Rezeptors auf die nachgeschalteten Signalwege. Sie konnten zeigen, dass es in mutierten Zellen, anders als in WT-Zellen, zu einer deutlichen Aktivierung des STAT5 Signalweges kommt. (Spiekermann et al. 2003)

Die Aktivierung erfolgt in diesem Fall direkt über den FLT3-Rezeptor und ist unabhängig von Src oder Jak2-Kinasen. (Choudhary et al. 2007)

Bei STAT5 handelt es sich um ein Gen, welches auf dem Chromosom 17 zu finden ist und eine Vielzahl verschiedener Funktionen innerhalb der Zelle übernimmt. (Hennighausen und Robinson 2008)



Es hat unter anderem Einfluss auf die Zelldifferenzierung, die Proliferation und die Entwicklung der Zellen. Zudem greift es in Signalwege, welche Entzündungsprozesse sowie Apoptose regulieren, ein. (Debierre-Grockiego 2004)

Ein weiterer durch FLT3 ITD-Mutationen konstitutiv aktivierter Signalweg ist Akt. (Brandts et al. 2005)

Akt verfügt über einen weit verzweigten downstream Pathway und nimmt daher Einfluss auf viele unterschiedliche Funktionen der Zelle. Drei davon betroffene und inzwischen gut erforschte Signalwege sind der Foxo-, der GSK3- und der TSC2-Signalweg. Diese haben ebenfalls Einfluss auf das Zellüberleben, die Proliferation und das Zellwachstum. (Manning und Toker 2017)

Erk ist ein Teil des Ras/Raf/MEK/Erk Signalwegs, welcher eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus, der Proliferation sowie der Apoptose spielt. Durch die gemeinsame Aktivierung über Ras ist der Erk-Signalweg zudem eng mit dem Akt-Signalweg verknüpft. (McCubrey et al. 2006)

## 1.6 Crenolanib und Azacitidin

### 1.6.1 Tyrosinkinaseinhibitoren am Beispiel von Crenolanib

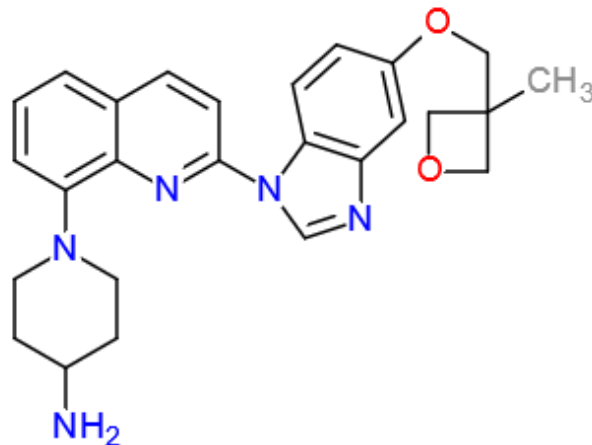


Abbildung 6: Strukturformel von Crenolanib

Unter Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) versteht man kleine Moleküle, welche über verschiedene Mechanismen die Aktivierung einer Tyrosinkinase unterbinden oder einschränken und dadurch die nachgeschalteten Signalwege hemmen. (Ballaschk 2014)

Nach ihrer Wirkungsweise werden fünf Typen von Tyrosinkinaseinhibitoren unterschieden.

TKIs vom Typ I konkurrieren mit dem eigentlich Substrat, in diesem Fall dem FL-Liganden, und binden an der ATP-Bindungsstelle des aktiven Rezeptors. Typ II TKIs versetzen den Rezeptor in eine inaktive Enzymkonfiguration.

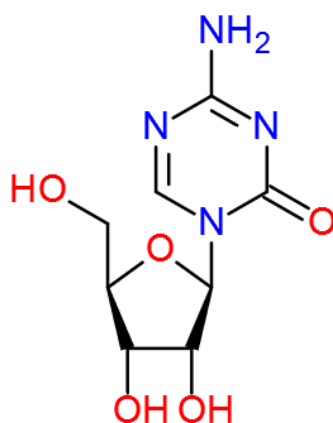
Typ III TKIs verhindern oder erschweren durch die Bindung an das allosterische Zentrum eine Bindung des Substrats, während TKIs des Typ IV eine reversible Wechselwirkung mit dem Substrat des Rezeptors eingehen und so eine Aktivierung verhindern. TKIs des TypV binden hingegen irreversibel an die Proteinkinase. (Bhullar et al. 2018)

Crenolanib ist ein Tyrosinkinaseinhibitor vom Typ 1, welcher eine hohe Selektivität sowie eine potente Inhibition des FLT3-Gens aufweist. (Smith et al. 2014)

Er hebt sich insbesondere durch seine stärkere zytotoxische Wirkung, im Vergleich zu Sorafenib und Quizartinib (Galanis et al. 2014) sowie seine hohe Kinaseselektivität auch gegenüber dem eng verwandten KIT-Rezeptor ab. Hierdurch kann eine Zytotoxizität durch die Inhibition des KIT-Rezeptors verhindert werden. Zudem zeigte Crenolanib eine deutlich geringere Anfälligkeit gegenüber resistenzvermittelnden Mutationen innerhalb des FLT3 Gens. (Smith et al. 2014, Zhang et al. 2019)

In den letzten Jahren wurde außerdem eine Vielzahl anderer Tyrosinkinaseinhibitoren in klinischen Studien getestet. Hierzu zählen Midostaurin, Sorafenib, Lestaurinib und Semaxanib. (Kindler et al. 2010)

### 1.6.2 Das Cytosinanaloga Azacitidin



**Abbildung 7: Strukturformel von Azacitidin**

Bei Azacitidin handelt es sich um ein Purinanaloga, welches anstelle von Cytosin in die RNA (80-90%) sowie die DNA(10-20%) der Zellen eingebaut wird. (Li et al. 1970)

Bereits vor 40 Jahren wurden die Wirkmechanismen von Azacitidin auf zellulärer Ebene untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Azacitidin zu einem veränderten Methylierungsmuster der neu synthetisierten DNA führt. Insgesamt kommt es durch die Inhibition der Methyltransferase zu einer Hypomethylierung. (Jones und Taylor 1980; Stresemann et al. 2008)

Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Azacitidin zu einem Zellzyklusarrest führen kann. (Montesano et al. 2013)

Außerdem ist Azacitidin ein wirksamer Inhibitor der Ribonukleotidreduktase, welche für die Bereitstellung von Desoxyribonukleotiden benötigt wird. (Aimiwu et al. 2012)

Aktuell wird Azacitidin vor allem in der Therapie des myelodysplastischen Syndroms (MDS) eingesetzt. Hier zeigt sich eine Verbesserung der Lebensqualität sowie eine Reduktion des Risikos für die Transformation des MDS in eine akute Leukämie. (Silverman et al. 2002)

Fenaux et al. konnten zudem zeigen, dass Azacitidin bei älteren Patienten mit AML und einem geringen Blastenanteil, zu einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens gegenüber der konventionellen Therapie führt. (Fenaux et al. 2010) Außerdem zeigte Azacitidin in bisher durchgeführten Studien eine gute Verträglichkeit mit einem geringen Nebenwirkungsprofil. (Dombret et al. 2015)

### **1.6.3 Rationale für die Kombinationstherapie mit Crenolanib und Azacitidin**

Die Behandlungsmöglichkeiten von älteren Patienten oder Patienten mit schweren Vorerkrankungen sind begrenzt, da eine Chemotherapie oder Stammzelltransplantation häufig nicht in Frage kommt. Hier konnten in der Vergangenheit jedoch Prognoseverbesserungen durch die Therapie mit Azacitidin erreicht werden. (Yun et al. 2016)

Ein weitere Behandlungsmöglichkeit der AML stellen die Tyrosinkinaseinhibitoren dar. Eine Monotherapie führt jedoch in der Regel nur zu einer Entfernung der Blasten aus dem Blut. Es kann jedoch keine vollständige Eradikation der leukämischen Stammzellen im Knochenmark, wo sie unter dem Schutz der Nische stehen, erreicht werden. (Parmar et al. 2011)

Bei Patienten die an einer FLT3-ITD positiven AML erkrankt sind, konnte durch eine kombinierte Behandlung mit Azacitidin und dem Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib jedoch eine Verbesserung des Überlebens, nach Rezidiv und bei Patienten, die nicht nach dem regulären Regime behandelt werden können, erreicht werden. (Ravandi et al. 2013)

Da Crenolanib auf Grund der oben beschriebenen Eigenschaften jedoch den potenten Tyrosinkinaseinhibitor darstellt, untersucht die vorliegende Arbeit die Kombination von Crenolanib und Azacitidin.

## 1.7 Migration und CxCr4

Die Chemokine SDF1alpha sowie CxCr4 spielen eine wichtige Rolle bei der Mobilisation und Migration von Stamm- und Blutzellen und somit auch bei der Entstehung von Tumoren und Leukämien.

Bei CxCr4 handelt es sich um einen Chemokinrezeptor, dessen Ligand der stromal cell-derived factor (SDF) oder auch CXC motif ligand 12 (CxCL12) darstellt.

Der Rezeptor ist G-Protein gekoppelt und weist mehrere Transmembrandomainen auf. Er spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung, der Migration und der Regulation von Immunantworten. (Murphy et al. 2000)

Bernardini et al. konnten eine starke Expression von CxCr4 auf immaturren natural-killer Zellen zeigen. Hier spielt er eine wichtige Rolle in der Mobilisation der Zellen. Eine verringerte Aktivierung von CxCr4 führte in den Versuchen zu einer vermehrten Ausschwemmung der NK-Zellen in das periphere Blut. (Bernardini et al. 2008)

Es wird vermutet, dass eine CxCr4 Aktivierung zu einem Anstoßen der Signalwege von STAT5, Akt und Erk führt. Über diesen Weg bedingt CxCr4 eine vermehrte Proliferation und ein verbessertes Zellüberleben. (Busillo et Benovic 2007)

CxCr4 und CxCL12 üben zudem wesentliche Funktionen innerhalb der Stammzellnische und somit auf die Funktion der HSC und auch LSC aus. So konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an CxCr4 zu einem Shift im Zellzyklus der HSC führt - weg von der G0 und somit Ruhephase hin zu aktiven Vorläuferzellen. Zudem stehen die meisten HSC in Kontakt mit Zellen die eine große Menge CxCL12 exprimieren. Diese Zellen konnten dabei insbesondere in der Nähe des Endosteum bzw. in der Nähe von sinusidalen Endothelzellen nachgewiesen werden. (Sugiyama et al. 2006)

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin die Therapie der FLT3-ITD positiven AML hinsichtlich des hohen Rezidivrisikos nach erfolgreicher Primärtherapie zu verbessern.

Als Arbeitshypothese wurde angenommen, dass es durch die Kombination der bekannten Wirkstoffe Crenolanib und Azacitidin möglich ist, den Schutz, welcher durch das Stroma bzw. die hämatopoetische Nische auf die leukämischen Stammzellen ausgeübt wird, zu überwinden.

Dies ist für die Therapie der Leukämie von besonderer Bedeutung, da durch die Nische nicht nur gesunde Stammzellen unterstützt und geschützt werden, sondern dieser Schutz auch verhindert, dass alle leukämischen Stammzellen durch eine Therapie abgetötet werden können. Doch gerade dieser Schritt ist entscheidend, um eine langfristige Genesung zu erreichen.

Zudem wurde in dieser Arbeit untersucht inwieweit Crenolanib allein oder in Kombination mit Azacitidin eine Auswirkung auf die Zellteilungsrate, das Migrationsverhalten der Zellen und die Signaltransduktionswege des FLT3-Signalwegs haben kann.

Dafür wurde in vitro das Überleben der Zellen, der Zellzyklus, das Migrationsverhalten sowie die Veränderungen des Signalwegs am Beispiel von FLT3, STAT5, Akt und Erk unter der Therapie mit Crenolanib und Azacitidin untersucht.

Um möglichst realistische Ergebnisse zu erhalten, wurden die gut erforschte Zellreihe BaF3 sowie im weiteren Verlauf CD34+ CD38- Blasten verwendet, welche aus dem Knochenmark von mit FLT3-ITD+ AML erstdiagnostizierten Patienten gewonnen wurden (Ethikvotum 538/16 S vom 14.12.2016).

Zur Simulation der Knochenmarksnische und der damit verbundenen Auswirkungen auf die behandelten Zellen wurden zudem die Zelllinie E108 verwendet.

Durch dieses Vorgehen konnte die direkte Wirkung von Crenolanib und Azacitidin auf die leukämischen Zellen untersucht und zugleich der Schutzmechanismus durch das Knochenmarksstroma dargestellt werden. Nur wenn dieser Schutz überwunden werden kann, hätte die Therapie mit Crenolanib alleine oder in Kombination mit Azacitidin einen positiven Effekt auf das Rezidivrisiko der behandelten Patienten.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Blutbildung ist die Migration der Zellen innerhalb des Knochenmarks in Richtung des peripheren Bluts. Auch hier wurde untersucht, ob eine Behandlung mit den genannten Wirkstoffen das Verhalten der Zellen verändert.

### 3 Material

#### 3.1 Verwendete Zelllinien

##### 3.1.1 Suspensionszelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Hersteller</b>
Ba/F3 ITD598/599(12)_PIG	Geschenk von Prof. T. Fischer
Ba/F3 FLT3-WT_PIG	Geschenk von Prof. T. Fischer
Ba/F3 parental (murine pre-B-Zelllinie)	DMSZ

**Tabelle 3:** Suspensionszelllinien

##### 3.1.2 Adhärenzte Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Hersteller</b>
E108-1D2	Geschenk von R. Oostendorp

**Tabelle 4:** Adhärenzte Zelllinien

##### 3.1.3 AML Patientenproben

<b>ID</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>NPM1</b>	<b>FLT3-ITD+</b>
AML M282	weiblich	64	negativ	positiv
AML M283	weiblich	46	positiv	positiv
AML 807	weiblich	67	negativ	positiv

**Tabelle 5:** AML FLT3-ITD positive Patientenproben

### 3.2 Medikamente

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Crenolanib	Selleckchem
Azacitidin	Celgene Corp

**Tabelle 6:** Medikamente

### 3.3 Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose Neo Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua	Braun
Benzamedin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
DC Protein Assay	Bio-Rad
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich , Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure 100%	Carl Roth, Karlsruhe
Ficoll	Biochrom GmbH, Berlin
Kälberserum (FCS)	Biochrom GmbH
Gelatine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gibco alpha Mem	Life Technologies, Carlsbad
Gibco DPBS (1 x)	Life Technologies, Carlsbad
Gibco DMEM (1 x)	Life Technologies, Carlsbad
Gibco HBSS 10%	Life Technologies, Carlsbad
Gibco HEPES	Life Technologies, Carlsbad

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Gibco IMDM	Life Technologies, Carlsbad
Gibco L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad
Gibco 2-Mercaptoethanol	Life Technologies, Carlsbad
Gibco Pen/Strep	Life Technologies, Carlsbad
Gibco RPMI	Life Technologies, Carlsbad
Glycerol 100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	J.T. Baker
mIL-3	R&D System, Wiesbaden
Milchpulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS) 10%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumflurid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Na <sub>2</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Page Ruler Plus (Protein Ladder)	Thermo Scientific
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tryptanblau 0,4%	Life Technologies, Carlsbad
Trypsin 0,5%	Life Technologies, Carlsbad
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

**Tabelle 7:** Chemikalien



### 3.4 Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Eismaschine	S-No.: 061244	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen, Deutschland
ELISA-Reader	ELx800	Bio-TEK Instruments, INC.
Entwickler	X-Ray Film Processor	Optimax
FACS	Cyan ADP LxP8	Beckman Coulter Inc. U.S.A
Gelelektrophoresekammer	Sub-Cell Gt	Bio-Rad
Gelkammer		Bio-Rad
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Heizplatte	Electrosicrührer	Vari Mag
Inkubator	CO2 Inkubator	Sanyo
Mikroskop	CK40	Olympus
Nano Drop	Nano Drop 2000 C	Thermo Scientific
pH-Meter	Toledo Seven Easy	Mettler
Sterile Werkbank	Hera Safe	Hera
Sonografiergerät	Sonopuls	Bandelin
Schüttler	W12	Biometra
Traffo	Power-Pac 300	Bio-Rad
Traffo	Power-Pac HC	Bio-Rad
Traffo	Power Pack P25T	Biometra
Transferkammer	Trans-Blot	Bio-Rad
Vortexer	IKA MS1 minishaker	Werke und Co, Staufen im Breisgau, Deutschland
Waage	Eg	Kern
Wasserbad		Memmert
Zählkammer	Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH, Lauda Königshoven, Deutschland

<b>Gerät</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
Zentrifuge	Multifuge 3s	Heraeus
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf

**Tabelle 8:** Geräte

### 3.5 Antikörper

#### 3.5.1 Primäre Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Epitop</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Phospho-Flt3	Tyr 591	1:1000	Cell Signaling
Anti-Flt-3/Flk-2	Kinase insert region	1:1000	Santa Cruz
Anti-Phospho-Stat5	Tyr 694	1:1000	Cell Signaling
Anti-Stat 5	3H7	1:1000	Cell Signaling
Anti-Phospho-Akt	Ser 473	1:1000	Cell Signaling
Anti-Phospho-Akt	Thr 308	1:1000	Cell Signaling
Anti-Akt	Endogenous levels of Akt1, Akt2, Akt3	1:1000	Cell Signaling
Anti-Phospho-Erk	Tyr 204	1:1000	Santa Cruz
Anti-Erk 1	Subdomaine XI	1:1000	Santa Cruz
Anti- $\beta$ -Aktin	N-Terminal	1:2000	Sigma Aldrich
Anti- $\beta$ -Tubulin		1:1000	Cell Signaling

**Tabelle 9:** Primäre Antikörper

### 3.5.2 Sekundäre Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
ECL Anti-Mouse IgG	1:10 000	GE Healthcare
ECL Anti-Rabbit IgG	1:10 000	GE Healthcare

**Tabelle 10:** Sekundäre Antikörper

### 3.5.3 FACS Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Annexin V APC	2µl / Ansatz	BD Pharmingen
APC BrDU Kit		BD Pharmingen
APC CxCr4	2µl/Ansatz	BD Pharmingen
CD135 - APC	20µl/Ansatz	BD Pharmingen
CxCr4 Isotyp	2µl/Ansatz	BD Pharmingen
PE Mouse IgG1 K Iso- typkontrolle	10µl/Ansatz	BD Pharmingen
Prodiimidid (Pi)	1µl /Ansatz	Thermo Fisher

**Tabelle 11:** FACS Antikörper

## 3.6 Software

<b>Firma</b>	<b>Programm</b>	<b>Funktion</b>
GraphPad Software	GraphPad Prism 5	Dokumentationssoftware
Tree star	FlowJo Software	Analyse von FACS-Daten
	ImageJ	Western Blot Auswertung

**Tabelle 12:** Software

### 3.7 Standardlösungen und -puffer

#### 3.7.1 Amido black stain

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
Methanol (100%)	100 mL
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> (100%)	100 mL
H <sub>2</sub> O	800 mL

**Tabelle 13:** Amido black stain

#### 3.7.2 Annexin/Pi Puffer

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
NaCl 2.5 M	28 mL
Hepes 1M pH 7.4	5 mL
CaCl <sub>2</sub>	0,18 g
H <sub>2</sub> O	467 mL
0.22 µm steril gefiltert	

**Tabelle 14:** Annexin/Pi Puffer

#### 3.7.3 HEF2+ Puffer

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
HBSS 10X	100 mL
FCS (hitzeinaktiviert)	20 mL
Hepes	10 mL
PenStrep	10 mL
H <sub>2</sub> O	860 mL
0.22 µm steril gefiltert	

**Tabelle 15:** HF2+ Puffer

### 3.7.4 1x Lysis Puffer

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
5x Lysis Puffer	20 mL
25 Phosphat-Puffer (pH=7)	4 mL
5xNa-Pyrophosphat (pH=7-7,5)	20 mL
10x NaF	10 mL
100x Benzamidin	1 mL
100x PMSF	1 mL
100x Orthovanadate	1 mL

**Tabelle 16:** 1x Lysis Puffer

### 3.7.5 5x Lysis Puffer

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
TRIS (1m)	20 mL
NaCl(2,5M)	60 mL
EDTA(0,1M)	10mL
Triton X-100	10 g
H <sub>2</sub> O	100 mL

**Tabelle 17:** 5x Lysis Puffer

### 3.7.6 2x Protein-Loading Buffer (LB)

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
DTT(1M)	10 mL
TRIS (1M) pH=6,8	5 mL
SDS 10%	20 mL
Bromphenolblau 1%	2,5 mL
Glycerol 100%	10 mL

**Tabelle 18:** 2x Protein-Loading Buffer (LB)

### 3.7.7 10x Running-Buffer

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
Glycin	288 g
TRIS	60 g
SDS	20 g
mit destilliertem Wasser auf 2L auffüllen	

**Tabelle 19:** 10x Running-Buffer

### 3.7.8 10x TBS

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
Tris	24,2 g
NaCl	80 g
dest. H <sub>2</sub> O	1 L
pH 7,6 (HCl)	

**Tabelle 20:** 10x TBS

### 3.7.9 Transferpuffer

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
dest. H <sub>2</sub> O	3,5 L
Methanol	1 L
10x Running-Buffer	0,5 L

**Tabelle 21:** Transferpuffer

### 3.7.10 BaF3-Medien

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
FCS	50mL
RPMI1690	450mL

**Tabelle 22:** BaF3-Medium

### 3.7.11 Stroma-Medium

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
$\alpha$ -Mem	400 mL
FCS (hitzeinaktiviert)	75 mL
Pferdeserum (hitzeinaktiviert)	25 mL
Penicillin/Streptomycin	5 mL
10 $\mu$ M beta - Mercapto-ethanol	100 $\mu$ L
0.22 $\mu$ m steril gefiltert	

**Tabelle 23:** Stroma-Medium

### 3.7.12 Freeze-Medium

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
FCS	45 mL
DMSO	5 mL

**Tabelle 24:** Freeze-Medium

### 3.7.13 Gelatine 0.1%

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
Gelatine	5 g
H <sub>2</sub> O	500 mL

**Tabelle 25:** Gelatine 0.1%



## **4 Methoden**

### **4.1 Allgemeine Zellkultur**

#### **4.1.1 Kultivierung von Zelllinien**

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% kultiviert. Die verwendeten Medien sind unter 3.7.2 aufgelistet.

Die sonst für FLT3 negativen BaF3 Zellen wurden, mit einem humanen FLT3-ITD-Vektor bzw. FLT3-WT-Vektor transfiziert, von Prof. Dr. Thomas Fischer (Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) bezogen.

Zudem wurden parentale BaF3-Zellen als Referenz über German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DMSZ) erworben. Diese wurden, wie auch die WT-transfizierten Zellen, nach den Angaben des Herstellers in BaF3-Medium kultiviert und mit murinem IL3 behandelt. Die FLT3-ITD positiven Zellen wiesen hingegen ein IL3 unabhängiges Wachstum auf.

Die EI08 Zellen wurden bis Passage 12, nach Anweisungen des Herstellers (Oosten-dorp et al. 2002), in Stromamedium kultiviert. Dafür wurden mit 0,1% Gelatine beschichtete Zellkulturplatten verwendet. Die Platten wurden vor der Aussaat für 30 Minuten bei 37°C mit 0,1%-iger Gelatine inkubiert.

Um eine stabile 80-90%-ige Konfluenz der Zellen für die Co-Kulturversuche zu erhalten, wurden  $0,42 \times 10^5$  Zellen pro Quadratzentimeter verwendet.

Für die Langzeitkulturen wurden die EI08 Zellen zudem bei einer Konfluenz von 80% mit 30 Gy bestrahlt und danach für 7 Tage regeneriert.

Zur Durchführung von Co-Kulturversuchen wurden die EI08-Zellen einmal mit PBS gewaschen und im Anschluss BaF3- oder mononucleare Zellen in ihrem jeweiligen Medium hinzugegeben.

#### **4.1.2 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung von Zellzahl und Vitalität der Zellen erfolgte mit Hilfe von Trypan Blau in einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop.

#### **4.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien**

Zur Langzeitaufbewahrung wurden bis zu  $1 \times 10^8$  Zellen in 1 mL hitzeinaktiviertem FCS mit 10% DMSO aufgenommen und in Cryotubes überführt. Unter Verwendung eines Cryokontainers wurden die Zellen dann langsam (-1°C/Minute) auf -80°C gekühlt und die Proben anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen erfolgte in einem 37°C Wasserbad. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in einen 50ml Falcon überführt und zweimal mit PBS oder IMDM (bei Primärmaterial) gewaschen um DMSO-Reste zu entfernen.

Knochenmarksproben wurden zusätzlich für fünf Minuten mit 200 µg/mL DNase bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Verklumpung zu verhindern.

#### **4.1.4 Extraktion mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation**

Mononukleäre Zellen wurden von Patienten mit neu diagnostizierter AML, nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung (Ethikvotum 538/16 S vom 14.12.2016), mittels Dichtegradient-Zentrifugation aus Aspirations- oder Hüftkopfknochenmarksproben gewonnen.

Dafür wurden die frischen und heparinisierten Proben 1:1 mit IMDM gemischt und auf 12ml Ficoll geschichtet. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 1200xg konnten die Zellen aus der Phase zwischen Plasma und Ficoll vorsichtig entnommen und wie unter Punkt 4.1.3 beschrieben eingefroren werden.

## **4.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **4.2.1 Erzeugen von Zellysaten**

Zur Gewinnung zellulärer Proteine wurden zunächst die Zellwände durch Lyse zerstört.

Dafür wurden die geernteten Zellen mit PBS + Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub> gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde jede Probe in 200µL Lysebuffer resuspendiert und mittels Ultraschall durchmischt. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 4°C für 20 Minuten bei 14000rpm zentrifugiert.

Es erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration, wie unter 4.2.2 beschrieben. Im Anschluss wurden je 50µg Protein für die weiteren Versuche eingefroren.

### **4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels DC Protein Assay**

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des DC Protein Assay Kit II. Dabei wurde nach Angabe des Herstellers gearbeitet und die Protein Absorption mit einem ELx800 Universal Microplate Readers gemessen.

### **4.2.3 Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)**

Bei der SDS-Page wurden Proteine mithilfe eines elektrischen Feldes, nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierfür wird sich die Bindung des SDS an die hydrophoben Proteinanteile

zu Nutzen gemacht.

Zur Vorbereitung wurden 50µg Protein aufgetaut und für 10 Minuten zusammen mit einem Loading Buffer bei 95°C aufgeköcht. Danach erfolgte der Transfer auf ein 4-15% Mini Protean TGX stain free Gel.

Die Auftrennung erfolgte bei zunächst 60V und anschließend bei 120V in einer Gelelektrophoresekammer.

#### **4.2.4 Immunochemischer Nachweis von Proteinen**

Für den immunochemischen Nachweis wurden die aufgetrennten Proteine, unter Verwendung einer horizontalen Transferkammer, 3,5 Stunden bei 1A auf eine PVDV Membran gebロットet.

Nach dem Transfer erfolgte die Blockung in 5% BSA oder Milch mit TBS-T.

Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte bei 4°C über Nacht. Nachdem die Membran mit TBS-T gewaschen wurde, erfolgte die erneute Inkubation mit dem passenden Sekundärantikörper. Dafür wurden die Membranen erneut bei 4°C für 30 Minuten mit einem anti-rabbit bzw. anti-mouse Sekundärantikörper behandelt.

Unter Verwendung der enhanced chemiluminescence (ECL-) Methode konnten die Proteinbanden im Anschluss auf Kodakfilmen visualisiert werden.

Nach dem Entwickeln wurden die Antikörper mit Hilfe der Amino Black stain Lösung von der Membran gestrippt, und dann erneut über Nacht mit einem anderen primär-Antikörper inkubiert. Jede Membran wurde dabei maximal vier Mal gestrippt.

Die Auswertung der Signalintensität erfolgte über die Software ImageJ.

#### **4.2.5 FACS**

Für die durchgeführten FACS-Analysen wurden die Zellen zunächst mit Azacitidin, Crenolanib oder einer Kombination der beiden Wirkstoffe behandelt und im Anschluss mit PBS gewaschen.

Je nach Fragestellung erfolgte dann die Inkubation mit unterschiedlichen Oberflächen- und/oder intrazellulären Antikörpern und die anschließende Messung mit Hilfe des CyAn ADP LxP8. Die Details zu den einzelnen Färbungen können den entsprechenden Unterabschnitten entnommen werden.

Für die Auswertung wurde die Software FlowJo (Tree Star Inc.) verwendet. Hiermit war

es möglich die Ergebnisse entweder durch die Gegenüberstellung mit einer Negativkontrolle oder durch das Gaten spezifischer Markerkombinationen auszuwerten.

#### **4.2.5.1 Messung von Oberflächenproteinen**

Zum Nachweis der FLT-3-Vektoren in den BaF3 Zellen, wurden diese auf die Oberflächenexpression von CD135 (FLT3) untersucht. Dafür wurden die Zellen entweder mit einem CD135-APC-Antikörper oder einer passenden Isotypkontrolle für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im FACS untersucht.

#### **4.2.5.2 Annexin/Pi (Messung von Apoptose)**

Zur Durchführung der Apoptose-Messung wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen bevor sie mit 500  $\mu$ L Annexinpuffer, 2  $\mu$ L AnnexinV und 1  $\mu$ L Pi versetzt wurden. Danach wurden die Zellen für 15 Minuten bei 4°C inkubiert und dann innerhalb einer Stunde mittels FACS gemessen.

#### **4.2.5.3 BrDU (Zellzyklusanalyse)**

Für die Analyse der Einflüsse von Crenolanib und Azacitidin auf den Zellzyklus wurden die BaF3-FLT3-ITD Zellen zunächst wie beschrieben mit den beiden Wirkstoffen behandelt und dann mit 10  $\mu$ L pro mL Kulturmedium gemischt und dann für 30 Minuten inkubiert.

Im Anschluss wurden die Zellen mit 50  $\mu$ L Staining buffer sowie einem APC-Antikörper für 15 Minuten auf Eis behandelt.

Nach dem Waschen in 1mL Staining buffer und der Abzentrifugation (5 Minuten bei 200g) wurden die Zellen fixiert. Hierfür wurden sie in 100  $\mu$ L BD Cytfix/Cytoperm Buffer resuspendiert und für 20 Minuten inkubiert und anschließen mit 1X BD Perm/Wash Buffer gewaschen.

Danach folgte die Permeabilisierung mit 100  $\mu$ L BD Cytoperm Permeabilization Buffer Plus für zehn Minuten auf Eis. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte dann die Re-fixation. Hierfür wurden die Zellen erneut mit 100  $\mu$ L BD Cytfix/Cytoperm Buffer für fünf Minuten behandelt und im Anschluss gewaschen.

Nach der Zugabe von 100  $\mu$ L DNase für 1 Stunde bei 37°C erfolgte die Färbung von BrdU und der intrazellulären Antigene mittels Fluoreszenzfarbstoffen. Hierfür wurden diese mit den Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur in 50  $\mu$ L BD Perm/Wash Buffer inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Resuspension in 20  $\mu$ L 7-ADD Lösung zur Färbung der gesamten DNA und die Messung der Zellen mittels FACS.

## 4.3 Molekularbiologische Methoden

### 4.3.1 MTT Assay

Für die kolorimetrische Messung der Lebensfähigkeit und des Proliferationsverhalten der Zellen wurden 50.000 Zellen in 100  $\mu$ L Medium in einer 96 Well Platte ausgesät. In jedes Well wurden dann jeweils 20 $\mu$ L MTT-Lösung gegeben und die Platte bei 37°C inkubiert. Die Messung mittels eines ELISA Readers bei 490nm erfolgte sobald ein makroskopischer Farbumschlag sichtbar war.

### 4.3.2 Migrationsassay

Zur Untersuchung der Migration wurden Migrationsassays sowohl mit BaF3-ITD+ Zellen als auch mit aus Knochenmark gewonnenen CD34+/ITD+ Zellen durchgeführt. Dafür wurden spezielle zelldurchlässige Welleinsätze verwendet, in welche die zu untersuchenden Zellen gegeben wurden. Im unteren Bereich des Wells befand sich mit SDF1alpha versetztes Medium. Nach einer Inkubation von 4 Stunden bei 37°C wurde untersucht wie viele Zellen durch die Membran aus dem oberen in den unteren Abschnitt des Wells migriert waren.

Die verwendeten Zellen wurden vor dem Versuch zunächst in Co-Kultur mit EI08 für 24 Stunden mit DMSO, AZA, Crenolanib oder einer Kombination aus AZA und Crenolanib behandelt.

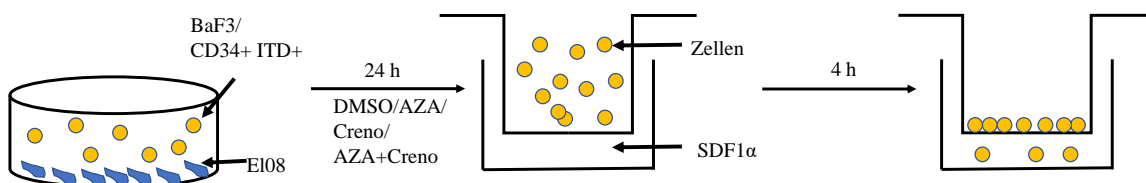


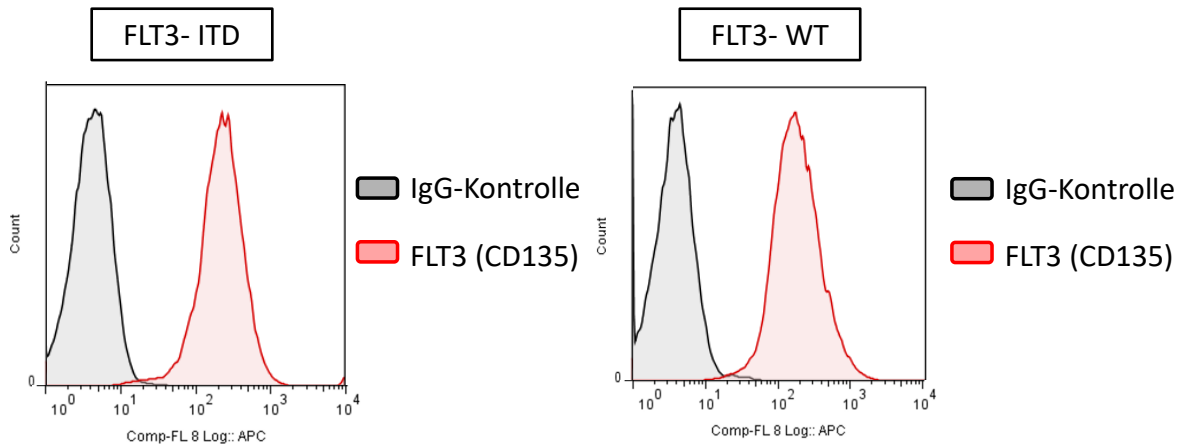
Abbildung 8: Migrationsassay mithilfe von speziellen Migrationswells.

## 4.4 Statistik

Zur Erstellung der Graphiken und Analyse der Experimente wurde das Programm GraphPad Prism5 (GraphPad Software) verwendet. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurden One-way-Annovas mit anschließendem Tukey-Test sowie der kombinierte und nicht kombinierte T-Test genutzt. In allen Analysen wurde ein P-Wert kleiner als 0,05 als signifikant angenommen (\*= $<0,05$ ; \*\*= $<0,01$ ; \*\*\*= $<0,001$ ). Wenn nicht anders angegeben handelt es sich bei allen Experimenten um eine Fallzahl von  $n=3$ .

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Charakterisierung der BaF3 Zellen



**Abbildung 9: Histogramm der Oberflächenfärbung des CD135-(FLT3-)Rezeptors auf BaF3-ITD- und WT-Zellen zur Kontrolle der Transfektion**

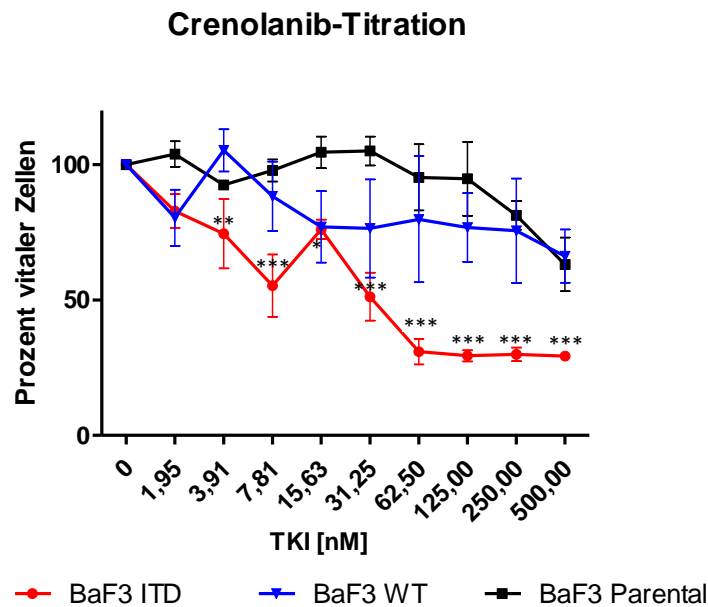
Dargestellt ist sowohl die Isotyp-Kontrolle als auch das dazu deutlich nach rechts verschobene FLT3 Signal. n=1

Die mit dem FLT-3-ITD- bzw. WT-Vektor transfizierten Zellen waren ein Geschenk von Prof. Dr. med. Thomas Fischer (Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg).

Zur Kontrolle der Transfektion und der Qualität der Zellen wurden diese mithilfe eines Antikörpers gegen den CD135-(FLT3-)Oberflächenrezeptor und einer entsprechenden IgG Kontrolle angefärbt und anschließend mittels FACS Analyse untersucht.

Für beide Vektoren ließ sich ein deutlicher Rechtsshift, im Vergleich zur Isotypenkontrolle, und somit ein eingebrachter Vektor mit FLT3-Gen in die BaF3-Zellen belegen.

## 5.2 Wirkung von Crenolanib auf BaF3 Zellen



**Abbildung 10: Vitalität von BaF3 Zellen unter verschiedenen Konzentrationen Crenolanib**  
MTT Assay nach 96 Stunden Behandlung mit Crenolanib.  $n=3 \pm$  SEM, angegeben sind die Signifikanzen im Bezug auf die Vitalität der unbehandelten Zellen

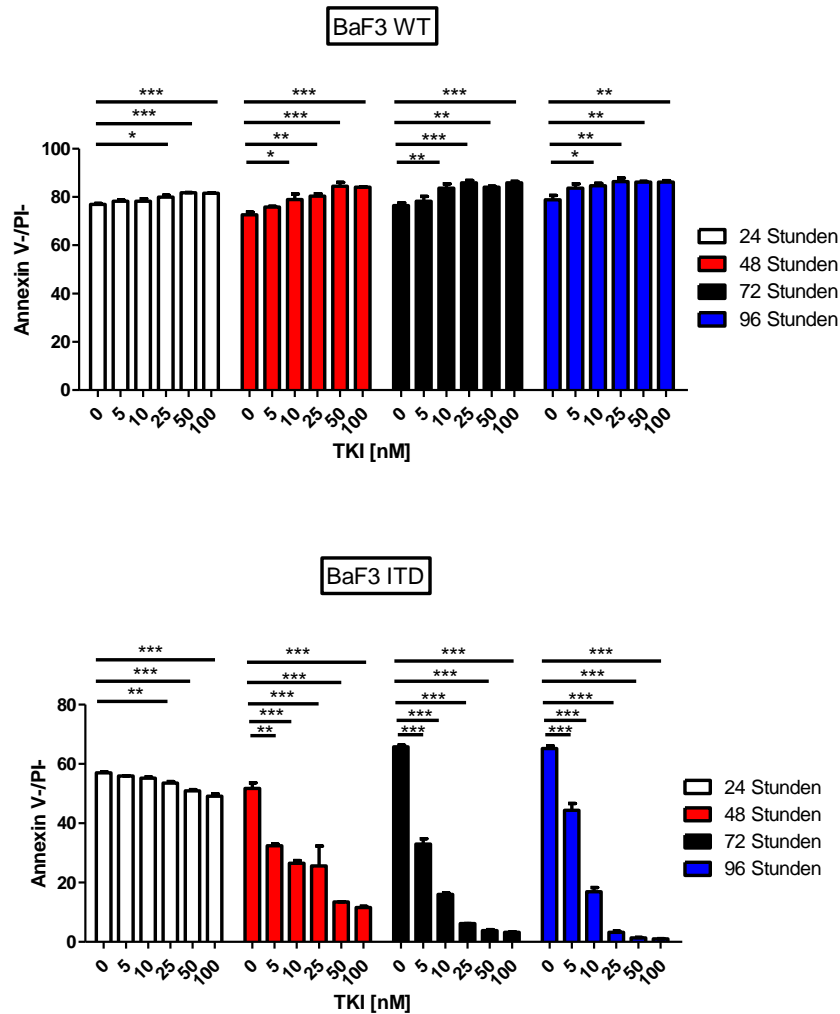
Im nächsten Schritt bestand die Zielsetzung eine geeignete Crenolanib-Konzentration für die folgenden Versuche zu ermitteln.

Dazu wurde zunächst ein MTT-Assay mit Crenolanib-Konzentrationen zwischen 0 und 500nM für 96 Stunden durchgeführt. Im Anschluss an die Behandlung wurde die Vitalität der Zellen mittels MTT-Agenz bestimmt.

Dabei konnte aufgezeigt werden, dass weder die Vitalität der untransfizierten BaF3 Zellen noch die der mit dem WT-Vektor transfizierten Zellen durch die Behandlung mit Crenolanib signifikant reduziert wurde.

Bei den mit dem FLT3-ITD-Vektor behandelten Zellen zeigte sich jedoch eine signifikante Reduktion der Vitalität ab einer Crenolanib-Konzentration zwischen 62,5 und 125nM.

Auf Grund des sehr unterschiedlichen Ansprechens der Zellen auf die Behandlung mit Crenolanib war die standardmäßige Bestimmung des IC50-Wertes nur begrenzt möglich. Daher fiel die Entscheidung für die folgenden Versuche mit einer Crenolanib-Konzentration von 100nM zu arbeiten um trotz allem einen bestmöglichen Vergleich der Versuchsergebnisse zu erzielen.



**Abbildung 11: Dosisabhängige Zytotoxizität auf BaF3 Zellen bei Behandlung mit Crenolanib**

Die Vitalität der Zellen wurde mittels AnnexinV/Pi Durchflusszytometrie, bei Crenolanibkonzentrationen von 0 bis 100nm, nach 24-96 Stunden bestimmt, n=3 ± SEM

Mit Hilfe des Annexin V/Pi-FACS-Assays wurde im Anschluss die zytotoxische Wirkung von Crenolanib auf die transfizierten BaF3-Zellen untersucht.

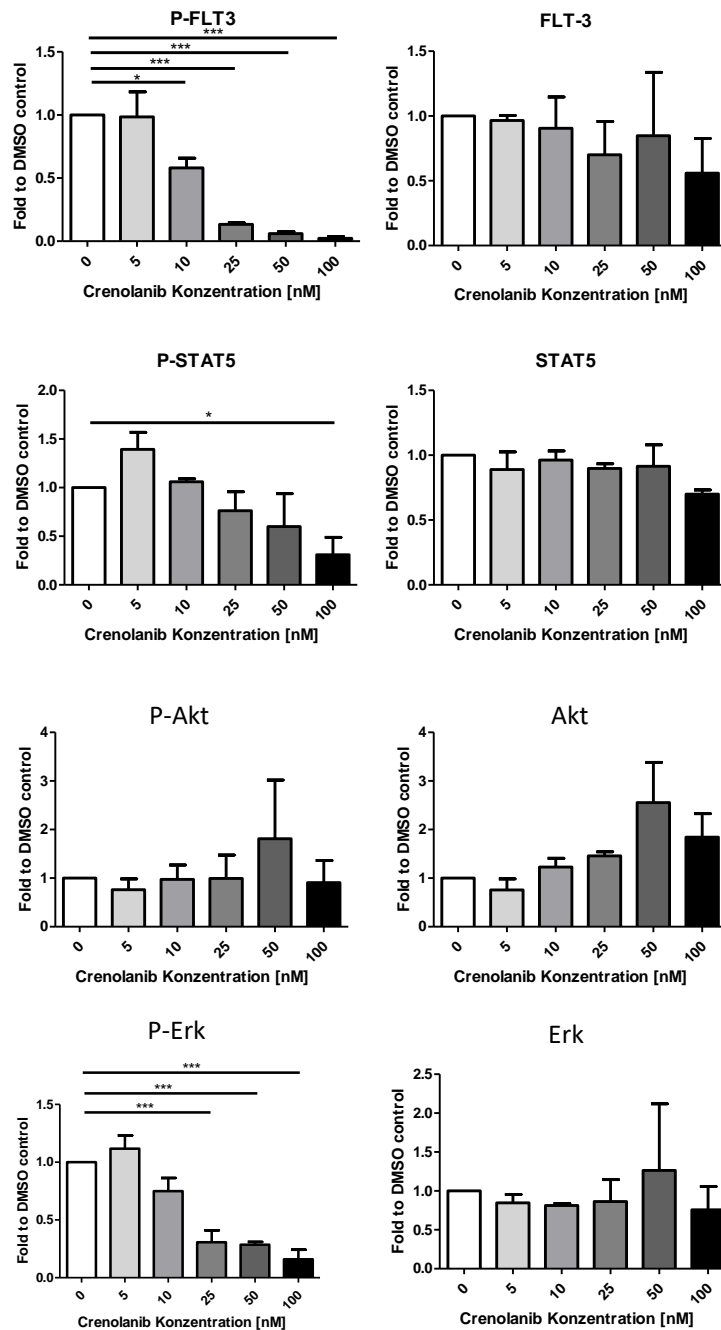
Dafür wurden die mit dem FLT3-ITD- bzw. FLT3-WT-Vektor behandelten Zellen mit Crenolanib in Konzentrationen von 0 bis 100nM für jeweils 24, 48, 72 und 96 Stunden behandelt.

Es zeigte sich, dass die FLT3-WT-Zellen durch eine Behandlung mit Crenolanib, auch über längere Zeit und in hohen Konzentrationen, nicht in Ihrer Vitalität eingeschränkt wurden.

Auf die Zellen mit dem FLT3-ITD-Vektor zeigte sich hingegen bereits nach 48 Stunden und geringen Konzentrationen von Crenolanib ein deutlicher zytotoxischer Effekt.

Da die Wirkung von Crenolanib auf die Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors in der Zelle sofort mit Behandlung beginnt, wurde in den folgenden Versuchen eine möglichst kurze Inkubationszeit von 30 Minuten bis maximal 24 Stunden gewählt.





**Abbildung 12: Wirkung von verschiedenen Crenolanibkonzentrationen auf den FLT3- und nachgeschaltete Signalwege**

Westernblot zur Darstellung des FLT3-, STAT5-, Akt- und Erk-Signalweg in FLT3-ITD transfizierten BaF3-Zellen nach der Behandlung mit Crenolanib in Konzentrationen von 0 bis 100nM für 24 Stunden, n=3 ± SEM

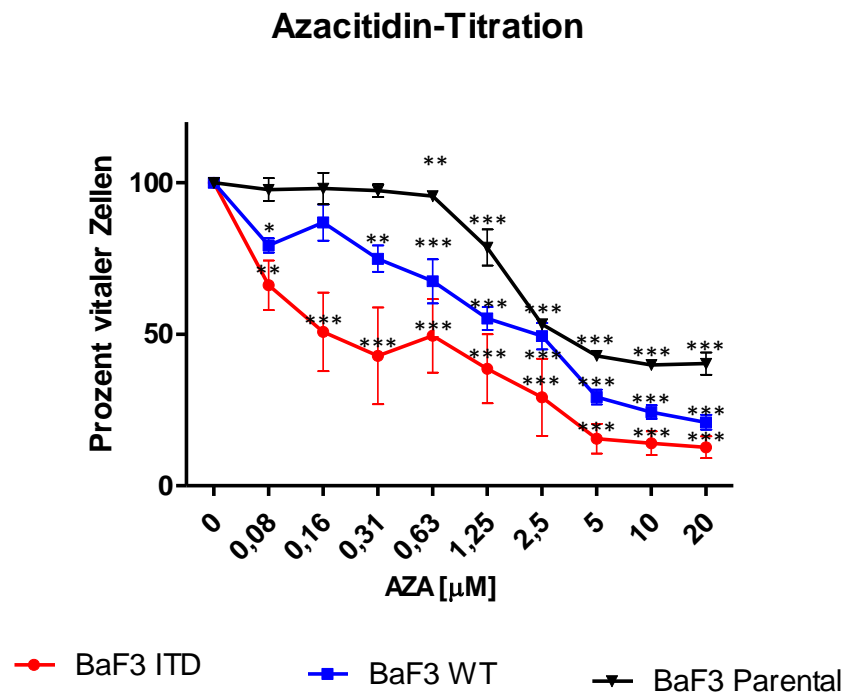
In einem letzten vorbereitenden Experiment wurde die alleinige Wirkung von Crenolanib auf die Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors, sowie auf die Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege STAT5, Akt und Erk, in FLT3-ITD transfizierten BaF3-Zellen untersucht.

Dabei zeigte sich bei 100 nM Crenolanib eine deutliche und signifikante Inhibierung

der Phosphorylierung von FLT-3, STAT5 und Erk. Die Konzentration der Rezeptoren blieb jedoch konstant.

Dies deutet darauf hin, dass Crenolanib keinen Einfluss auf die Expression der Rezeptoren sondern lediglich auf deren Aktivierung hat.

### 5.3 Zytotoxische Wirkung von Azacitidin auf BaF3-Zellen



**Abbildung 13: Vitalität von BaF3 Zellen unter verschiedenen Konzentrationen Azacitidin**  
 Die dosisabhängige Zytotoxizität wurde nach 96 Stunden Azacitidin Behandlung mittels MTT Assay bestimmt.  $n=3 \pm \text{SEM}$ , angegeben sind die Signifikanzen im Bezug auf die Vitalität der unbehandelten Zellen

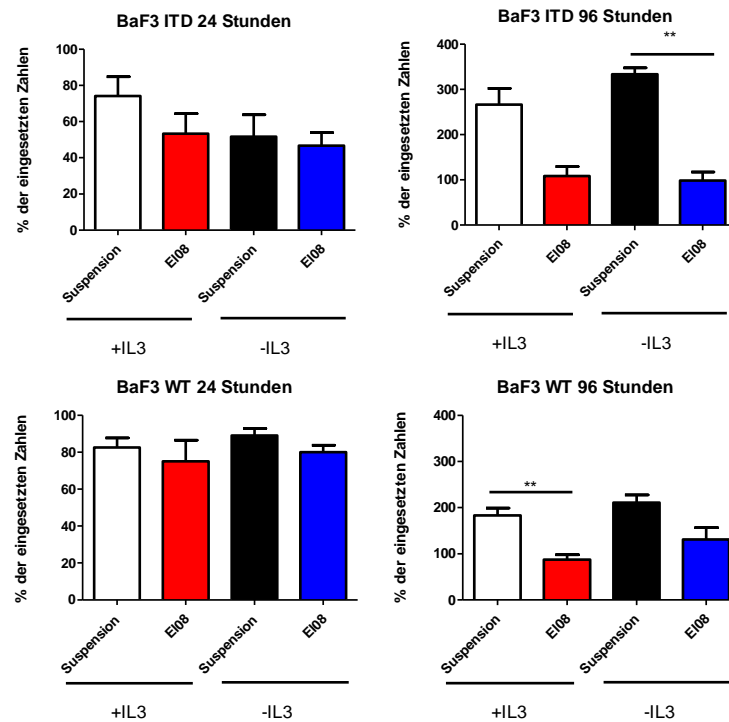
Für Azacitidin wurde ebenfalls mittels MTT Assay die zytotoxische Wirkung auf transfizierte und untransfizierte BaF3-Zellen untersucht.

Die Zellen wurden dafür über 96 Stunden mit Azacitidin-Konzentrationen zwischen 0 und 20 µM inkubiert und anschließend mit der MTT-Reagenz behandelt.

In diesem Experiment konnte für jede der drei Zelllinien eine mittlere inhibitorische Konzentration bei einer Azacitidin-Dosierung von 0,63 bis 2,5 µM, nach 96 Stunden nachgewiesen werden.

Bei den weiteren Versuchen wurde daher eine Azacitidin-Konzentration von 1 µM bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden verwendet. Dies entspricht in etwa einer Teilungszeit der BaF3-Zellen.

## 5.4 Stromakontakt führt zum Proliferationsstop von FLT3-ITD- und FLT3-WT transfizierten BaF3-Zellen



**Abbildung 14: Proliferation von BaF3-ITD- und WT-Zellen in Suspensionskultur bzw. in Co-Kultur auf EI08**

Die Kultivierung der BaF3-Zellen erfolgte in Suspension bzw. auf EI08 für 24 und 96 Stunden. Jeweils mit und ohne IL3 Behandlung,  $n=3 \pm \text{SEM}$

Des Weiteren wurde der Effekt einer Co-Kultivierung der BaF3-Zellen mit EI08-Zellen, als Model für das Knochenmarksstroma, auf das Teilungsverhalten der Zellen untersucht.

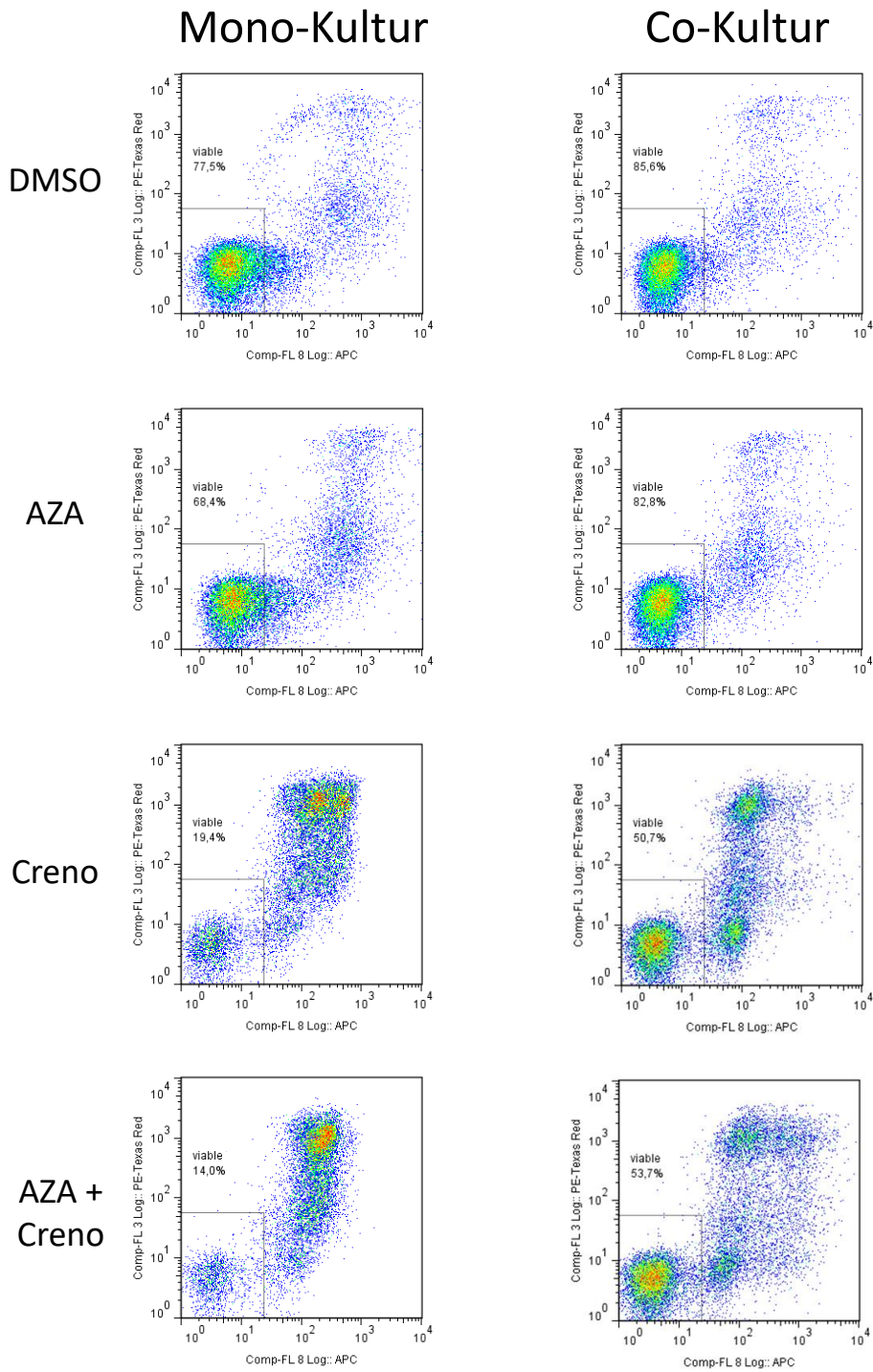
Dafür wurde eine definierte Anzahl von BaF3-Zellen für 24 bzw. 96 Stunden entweder in Co-Kultur mit EI08-Zellen oder alleine in einer Suspensionskultur kultiviert und im Anschluss eine erneute Bestimmung der Zellzahl durchgeführt.

Nach 24 Stunden ließ sich weder für die BaF3-ITD- noch die BaF3-WT-Zellen ein signifikanter Unterschied im Proliferationsverhalten, unabhängig von der Form der Kultivierung, zeigen.

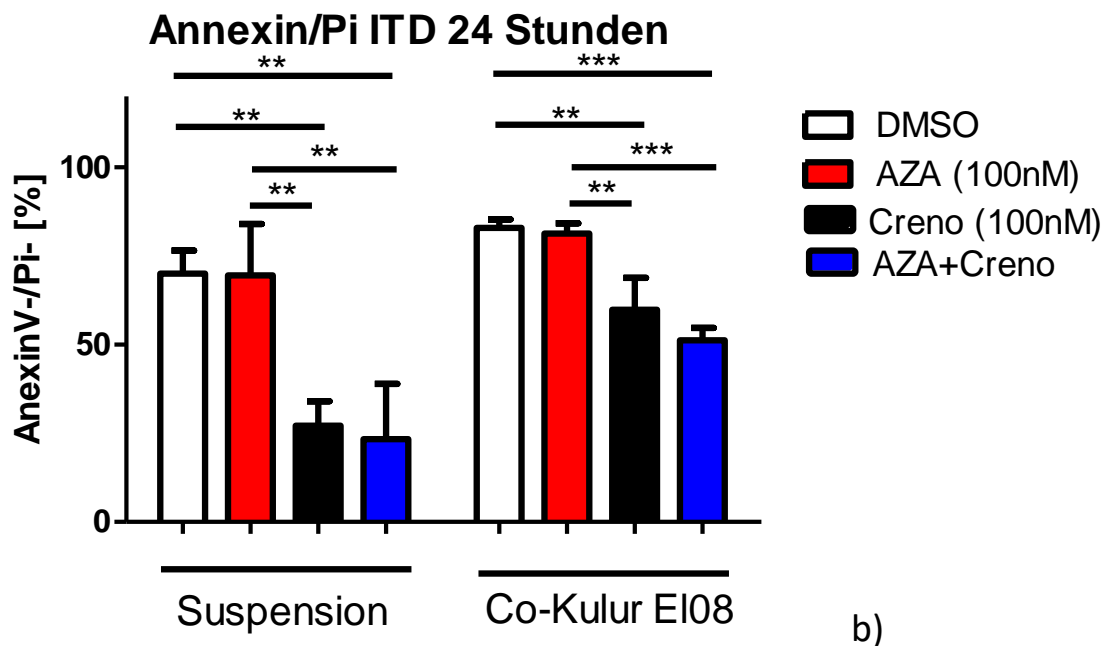
Nach 96 Stunden zeigten jedoch insbesondere die BaF3-ITD-Zellen einen deutlichen Anstieg der Zellzahl in der Mono-Kultur. Während die Zellzahl in der Co-Kultur weitestgehend unverändert zur Ausgangspopulation blieb, vervielfachten sich die Zellen in der Suspensionskultur in etwa um den Faktor 4.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass insbesondere die mit dem FLT3-ITD-Vektor transfizierten Zellen bei Stromakontakt in einen Zellzyklusarrest übergehen.

## 5.5 Wirkung der Kombination von Crenolanib und Azacitidin auf BaF3-WT- und -ITD-Zellen



a)



**Abbildung 15: Annexin/Pi-FACS Analyse zur Wirkung von Crenolanib und Azacitidin auf BaF3 FLT3-ITD+ Zellen in Suspensions- und Co-Kultur mit EI08**

a) Exemplarische Darstellung der FACS Analyse; b) statistische Erhebung zum Überleben der BaF3 FLT3-ITD+ Zellen unter der Behandlung mit DMSO, Crenolanib (100nM), Azacitidin (100nM) oder einer Kombination aus Crenolanib und Azacitidin für 24 Stunden,  $n=3 \pm \text{SEM}$

Nach Etablierung der Versuchsmethoden wurden sowohl die Effekte einer Monotherapie mit Azacitidin beziehungsweise Crenolanib als auch eine Behandlung mit der Kombination aus beiden Wirkstoffen auf die BaF3-Zellen untersucht. Dafür wurden sowohl die mit dem FLT3-ITD- als auch die mit dem WT-Vektor transfizierten Zellen wie bereits oben beschrieben behandelt.

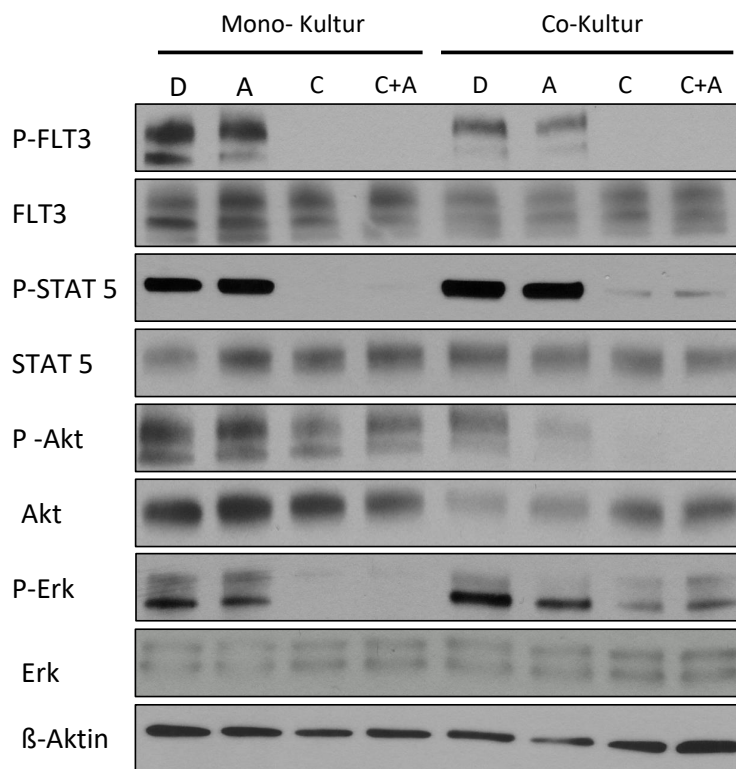
Um die Effekte der Wirkstoffe unter möglichst physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden die folgenden Experimente nicht nur in reiner Monokultur der BaF3-Zellen durchgeführt, sondern zusätzlich mit Co-Kulturen auf EI08-1D2 Zellen ergänzt. Diese dienen der Nachstellung von Wechselwirkungen zwischen hämatopoetischen Zellen und dem Stroma in vitro.

In einem ersten Schritt wurden die Effekte der Behandlung auf die Vitalität der Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass keiner der drei Behandlungsansätze einen signifikanten Einfluss auf die FLT3-WT-Zellen nehmen konnte. Dies galt sowohl für die Zellen in Mono- also auch in Co-Kultur.

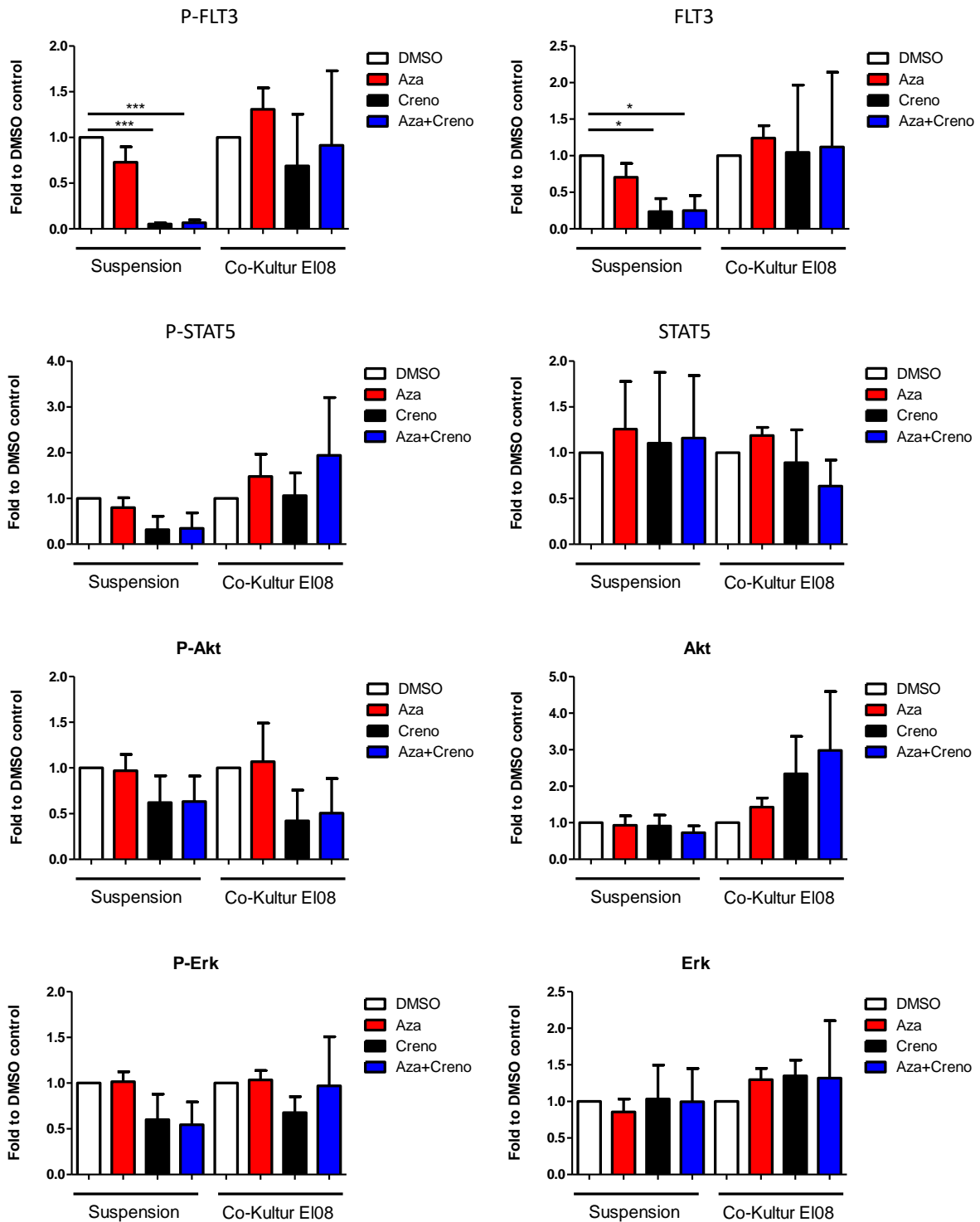
Auch für die FLT3-ITD positiven BAF3-Zellen konnte eine alleinige Behandlung mit Azacitidin weder in der Monokultur noch in der Co-Kultur mit EI08, einen signifikanten

Effekt auf das Überleben der Zellen ausüben. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in Monokultur sowohl eine alleinige Behandlung mit Crenolanib als auch eine Behandlung mit Crenolanib in Kombination mit Azacitidin zu einer Reduktion der Vitalität um ca. 60% führte.

Dieser Effekt zeigte sich in abgeschwächter Form auch für BaF3-ITD+-Zellen in der Co-Kultur mit EI08. Hier führte die Behandlung mit Crenolanib bzw. der Kombination aus Crenolanib und Azacitidin jedoch nur zu einer 30%igen Minderung der Vitalität. Insgesamt deuten die Ergebnisse jedoch daraufhin, dass die Stromaprotektion gegenüber dem Thyrosinkinaseinhibitor zumindest teilweise durch die Zugabe von Azacitidin überwunden werden kann.



**Abbildung 16: Wirkung von Crenolanib und Azacitidin auf den FLT3-Signalweg**  
Western Blot von BaF3 FLT3 ITD Zellen in Suspensions- und Co-Kultur mit EI08 nach Behandlung mit DMSO, Crenolanib (100nM), Azacitidin (100nM) oder einer Kombination aus Crenolanib und Azacitidin für 24 Stunden



**Abbildung 17: Wirkung von Crenolanib und Azacitidin auf den FLT-3-Signalweg**

Statistische Auswertung von Western Blots mit BaF3 FLT-3 ITD Zellen in Suspensions- und in Co-Kultur mit EI08 nach Behandlung mit DMSO, Crenolanib (100nM), Azacitidin (100nM) oder einer Kombination aus Crenolanib und Azacitidin für 24 Stunden.  $n=3 \pm \text{SEM}$

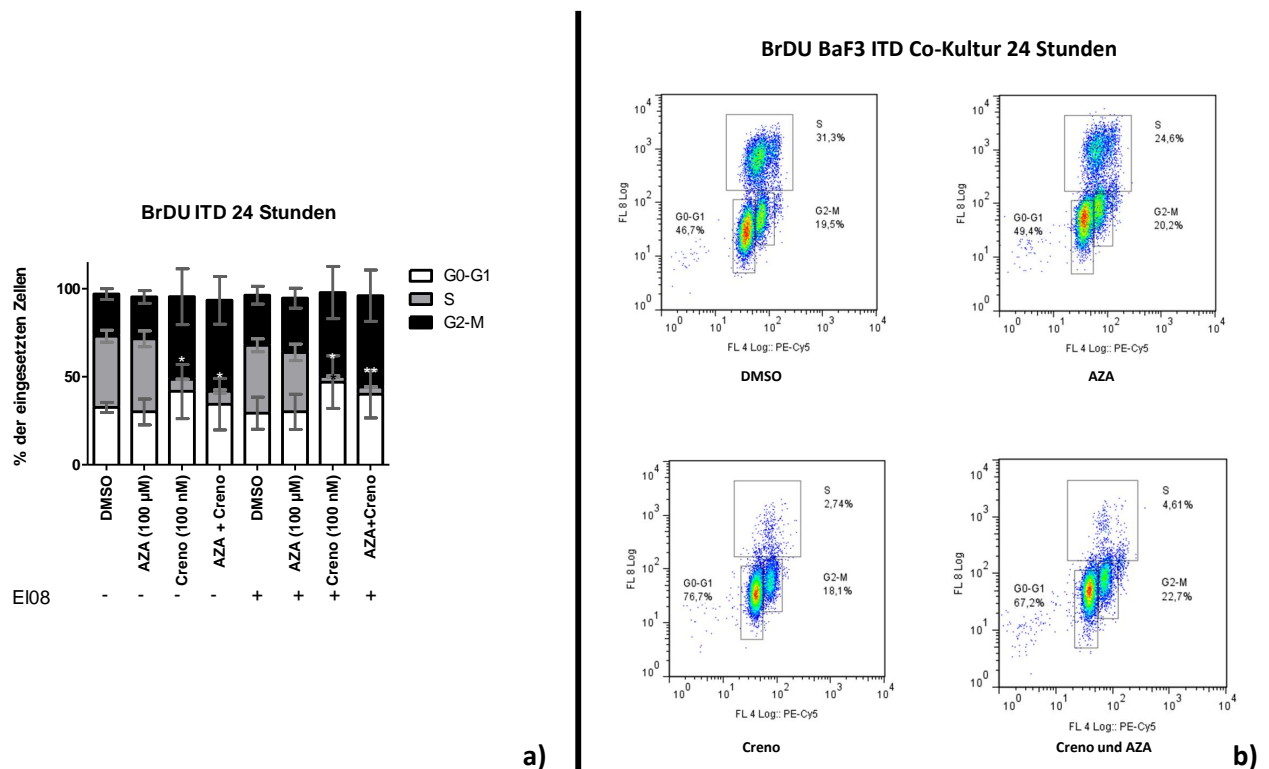
Als nächster Schritt wurde die Wirkung von Crenolanib und Azacitidin auf die Phosphorylierung von FLT3 und die Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege STAT5, Erk sowie Akt mittels Western Blot untersucht. Hierfür wurde zunächst das Zellmodell aus BaF3-FLT3-ITD+ Zellen in Suspension oder in Kombination mit EI08-Zellen ver-

wendet.

Dabei ließ sich insbesondere für FLT3 zeigen, dass eine Behandlung mit Crenolanib allein oder in Kombination mit Azacitidin nicht nur zu einer signifikanten Abnahme der Phosphorylierung führte, sondern auch die Gesamtproteinmenge des FLT3-Rezeptors deutlich abnahm. Dieser Effekt konnte vor allem in der Mono-Kultur nachgewiesen werden.

Ein ähnlicher Einfluss auf die Phosphorylierung ließ sich sowohl in der Mono- als auch in der Co-Kultur für den Transkriptionsfaktor STAT5, sowie die Serin/Threonin-Kinasen Erk und Akt nachweisen. Ein signifikanter Effekt auf die Phosphorylierung und die Gesamtproteinmenge von STAT5, Akt und Erk konnte jedoch nicht gezeigt werden. In dieser Untersuchung ließ sich, für die FLT3 spezifischen Signalwege, weder in der Suspensionskultur noch in der Co-Kultur ein zusätzlicher Effekt durch die Wirkstoffkombination von Crenolanib und Azacitidin zeigen.

## 5.6 Wirkung von Crenolanib und Azacitidin auf den Zellzyklus



**Abbildung 18: Zellzyklusanalyse mittels BrdU Assay**

a) Statistische Auswertung des BrdU Assays von BaF3-FLT3-ITD in Suspensionskultur bzw. Co-Kultur mit El08 nach der Behandlung mit DMSO, Azacitidin (100M), Crenolanib (100nM) oder der Kombination aus Azacitidin und Crenolanib für 24 Stunden,  $n=3 \pm SEM$

b) Exemplarische Darstellung der FACS Ergebnisse am Beispiel der BaF3-ITD+ Co-Kultur



Um zu untersuchen wie Azacitidin und Crenolanib ihren Effekt auf die Teilungsrate der BAF3-Zellen ausüben, wurde zudem eine Analyse des Zellzykluses durchgeführt.

Dafür wurden sowohl Zellen mit WT-Vektor als auch Zellen mit dem FLT3-ITD Vektor für 24 Stunden mit Azacitidin, Crenolanib oder einer Kombination aus beidem behandelt und im Anschluss mittels BrDU-Assays analysiert.

Dieser Versuchsaufbau wurde sowohl in BaF3-Monokultur als auch in BaF3-Co-Kultur zusammen mit E108-Zellen durchgeführt.

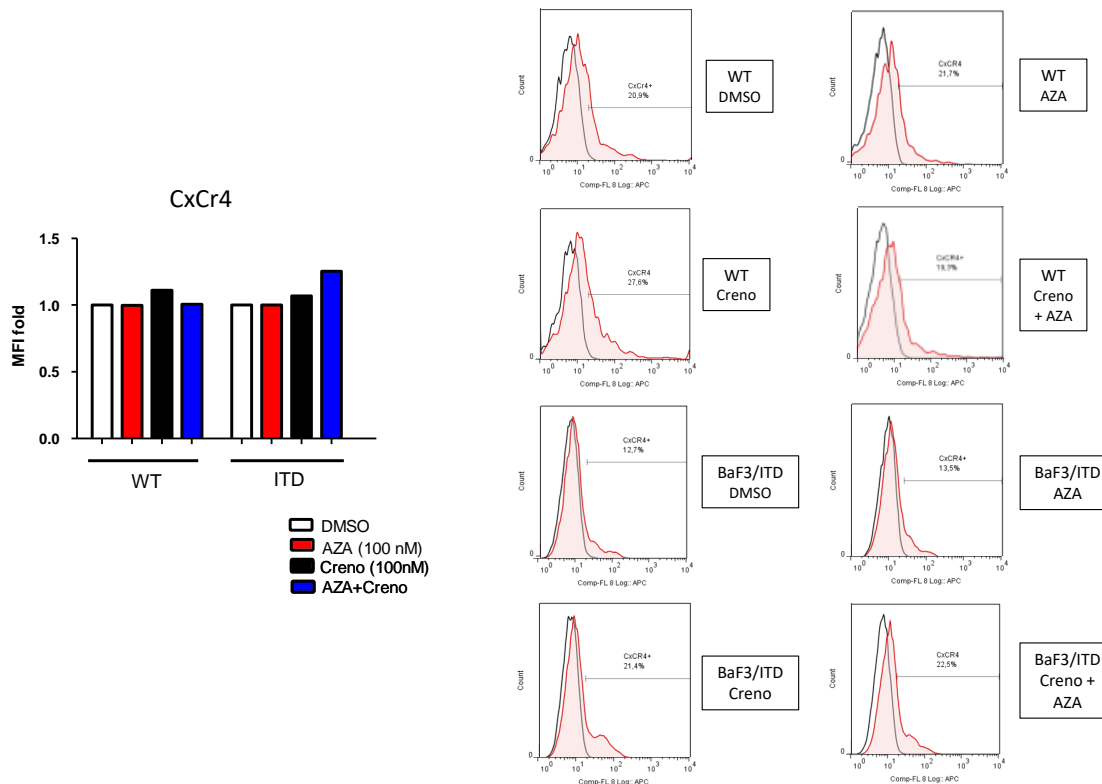
Betrachtet man die BaF3 FLT3-ITD positiven Zellen, so zeigt sich, dass insbesondere eine Behandlung mit Crenolanib zu einer deutlichen Abnahme der Zellen, welche sich in der S-Phase des Zellzykluses befinden, führt.

Hierbei kommt es sowohl zu einer signifikanten Verschiebung in die G0-G1 Phase als auch in die G2-M Phase.

Dieser Effekt tritt bei Zellen in Monokultur, und verstärkt bei Zellen in Co-Kultur mit E108 auf.

Die Therapie mit Crenolanib scheint also zu einer verringerten Syntheseleistung der Zelle zu führen. Infolge der fehlende DNA-Replikation kommt es dann zu einer Blockade des Zellzykluses. Dieser Effekt ist offenbar vom Schutz der Nische unabhängig, da sich das veränderte Zellzyklusverhalten sowohl in Suspensions- als auch in Co-Kultur nachweisen lässt.

## 5.7 CxCr4 Expression der BaF3-Zellen



**Abbildung 19: CxCr4 Expressionsmessung auf BaF3-ITD- und -WT-Zellen**

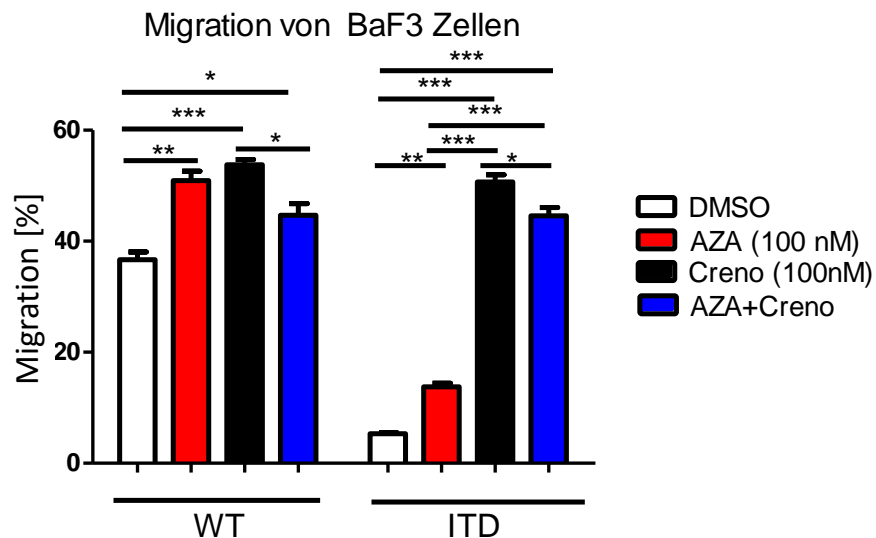
Die BaF3-Zellen wurden 24 Stunden mit DMSO, Crenolanib (100nM), Azacitidin (100nM) und der Kombination aus Crenolanib und Azacitidin behandelt. Danach erfolgte die Oberflächenfärbung auf CxCr4 mit anschließender FACS Analyse. n=1

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Entstehung einer AML ist die Mobilisierung und Wanderung leukämischer Zellen durch den Körper. Eines der dafür zuständigen Chemokine ist CxCr4.

In einem weiteren Schritt wurde in dieser Arbeit daher untersucht, wie sich die Expression von CxCr4 unter der Behandlung mit Azacitidin und Crenolanib verändert. Dafür wurde die Zellen zunächst mit Azacitidin, Crenolanib oder der Kombination aus beiden Wirkstoffen behandelt und im Anschluss eine Oberflächenfärbung auf CxCr4 durchgeführt. Danach wurden die Zellen per FACS Analyse ausgewertet.

Hierbei konnte, aufgrund fehlender Wiederholungen nicht signifikant, gezeigt werden, dass alle drei Behandlungsschemata zu einem Anstieg der CxCr4 Expression führen. Dieser Effekt ließ sich sowohl bei den BaF3-ITD+ als auch bei den BaF3-WT-Zellen nachweisen.

## 5.8 Migration der BaF3-Zellen



**Abbildung 20: Messung der Migration von BaF3-Zellen nach der Behandlung mit Azacitidin (100nM), Crenolanib (100nM) und der Kombination aus Beidem**

Nach der 24-stündigen Behandlung wurde die Migration der Zellen in Verbindung mit SDF1alpha in speziellen Migrationswells gemessen.  $n=3 \pm \text{SEM}$

In einem weiteren Experiment wurde zudem untersucht inwieweit sich die erhöhte CxCr4-Expression auf den behandelten Zellen auf das tatsächliche Migrationsverhalten der Zellen auswirkt.

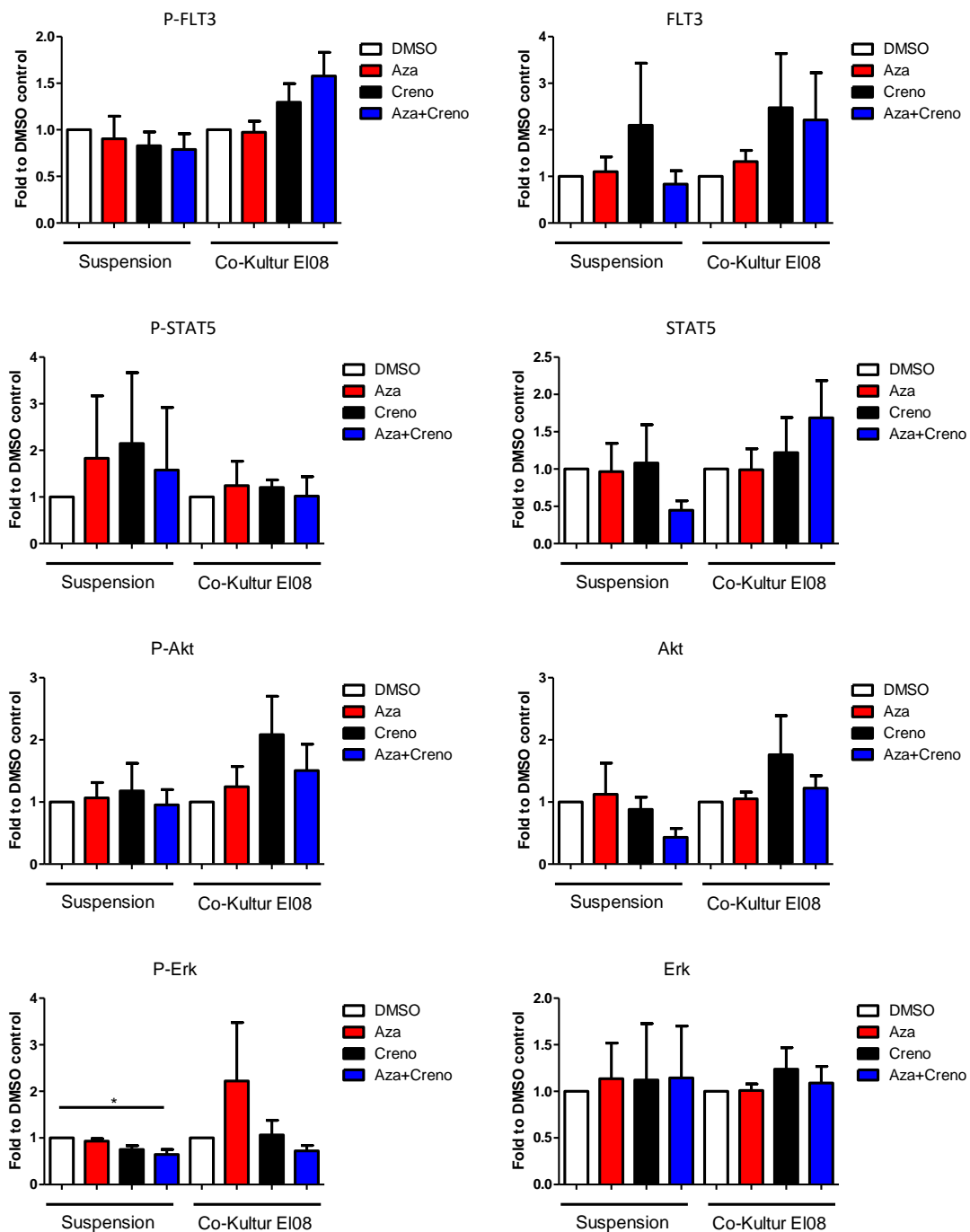
Für diese Untersuchung wurden spezielle Migrationseinsätze in einer 24 Wellplatte in Kombination mit dem Chemokine SDF1alpha verwendet.

Hier konnte gezeigt werden, dass es kongruent zu der erhöhten CxCr4-Rezeptorexpression auch zu einer deutlich signifikanten Steigerung der Migration bei den behandelten Zellen im Gegensatz zu den unbehandelten Vergleichskontrollen gekommen ist.

Dieser Effekt zeigte sich sowohl in den BaF3-WT als auch in den BaF3-ITD+ Zellen. In Letzteren war die Steigerung der Migration, insbesondere unter der Behandlung mit Crenolanib allein oder in Kombination jedoch deutlicher ausgeprägt. Dies wird auch dadurch verstärkt, dass die unbehandelten BaF3-ITD+ Zellen so gut wie keine Migration zeigten.

Die Behandlung mit Crenolanib scheint also die inhibierte Migration der ITD positiven Zellen gegenüber SDF1 wieder herzustellen.

## 5.9 Wirkung von Crenolanib auf den FLT-3 Signalweg in Primärmaterial



**Abbildung 21: Wirkung von Crenolanib und Azacitidin auf den FLT-3-Signalweg in CD34+ FLT3+ Zellen**

Statistische Auswertung von Western Blots aus FLT3-ITD positiven Patientenproben in Suspensions- und Co-Kultur mit EI08 nach der Behandlung mit DMSO, Crenolanib (100nM), Azacitidin (100nM) oder einer Kombination aus Crenolanib und Azacitidin für 24 Stunden. n=3 ± SEM

In der Endphase der vorliegenden Arbeit wurde die im BaF3-Zellmodell erlangten Ergebnisse in CD34+/ITD+ Zellen, welche aus Knochenmarksproben von an FLT3-ITD+ AML erkrankter Patienten gewonnen wurden, überprüft und nochmals in vitro verifiziert. Hierfür wurden ausschließlich Proben von Patienten mit der Erstdiagnose einer FLT-3 ITD positiven AML verwendet (Ethikvotum 538/16 S vom 14.12.2016).

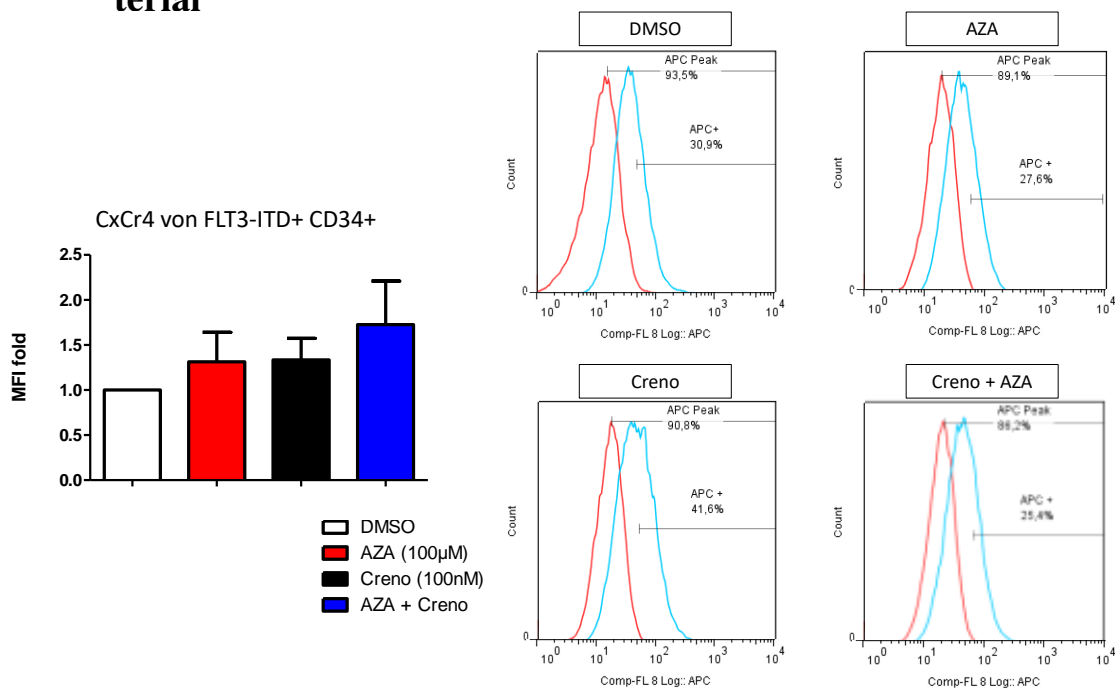
Dabei fand eine Fokussierung auf Einflüsse der Therapie auf den FLT3-Signalweg sowie auf die CxCr4-Expression und des Migrationsverhaltens der CD34+/ITD+ Zellen statt.

Entsprechend der Versuche im BaF3-Zellmodell wurde der FLT3-Signalweg mithilfe der Analyse von Western Blots untersucht.

Hier zeigte sich ebenfalls eine signifikant verminderte Phosphorylierung von Erk unter der Doppeltherapie mit Azacitidin und Crenolanib in Monokultur. Eine weitere Reduktion lässt sich auch für FLT3 vermuten, konnte in unserem Experiment jedoch nicht signifikant nachgewiesen werden.

Zudem zeichnete sich in diesen Versuchen ebenfalls der Trend einer verstärkten Protein-synthese insbesondere unter der Behandlung mit Crenolanib ab. Hier waren alle untersuchten Signalwege betroffen. Dieser Effekt konnte unter der gemeinsamen Kultur mit E108 verstärkt beobachtet werden.

## 5.10 Wirkung von Crenolanib und Azacitidin auf CxCr4 in Primärmaterial



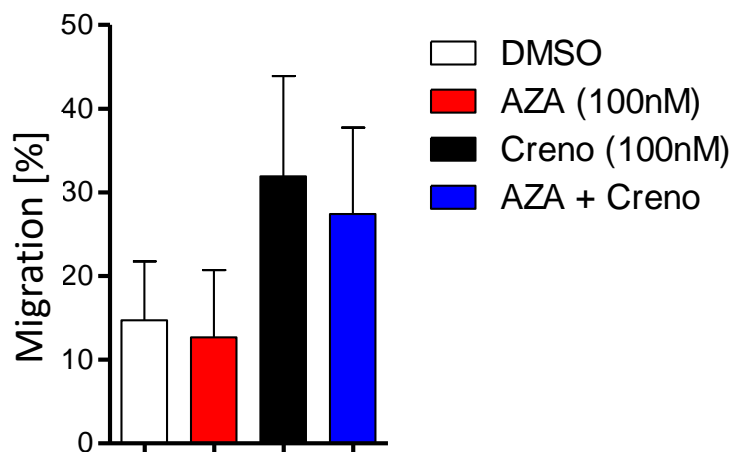
**Abbildung 22: CxCr4 Messung auf CD34+ CD38- Zellen aus FLT3-ITD+Patientenproben**  
Die CD34+/CD38- Zellen wurden 24 Stunden mit DMSO, Crenolanib (100nM), Azacitidin (100nM) und der Kombination aus Crenolanib und Azacitidin behandelt. Danach erfolgte die Oberflächenfärbung auf CxCr4 mit anschließender FACS-Analyse. n=3 ± SEM

Auch in den von an AML erkrankten Patienten gewonnen CD34+/CD38- Zellen wurde eine Untersuchung zur Expression von CxCr4 an der Zelloberfläche durchgeführt. Dafür wurden die Zellen entsprechend der Versuche mit BaF3-Zellen behandelt.

Kongruent zu den Versuchen im BaF3-Zellmodell führte sowohl die alleinige Behandlung mit Crenolanib bzw. Azacitidin als auch die Behandlung mit einer Kombination aus beiden Wirkstoffen zu einer verstärkten Expression von CxCr4 auf der Oberfläche der Zellen.

## 5.11 Migration von CD34/CD38- Zellen aus Primärmaterial

### Migration von FLT3-ITD+ CD34+



**Abbildung 23: Messung der Migration von CD34+ CD38- Zellen aus FLT3 ITD+ Primärmaterial**

Durchführung eines vier-stündigen Migrationsassays nach der Behandlung mit Azacitidin (100nM), Crenolanib (100nM) und der Kombination aus Beiden nach 24 Stunden auf einer Co-Kultur mit EI08. n=3 ± SEM

Als letzter Versuchsansatz wurde der Migrationsassay unter gleichen Bedingungen mit CD34+/CD38- Zellen wiederholt.

Hier zeigte sich entsprechend zu den Untersuchungen in den mit dem FLT3-ITD+ Vektor transfizierten BaF3-Zellen ein deutlicher, wenn auch nicht signifikanter, Anstieg der Migration nach der Behandlung mit Crenolanib alleine oder in Kombination mit Azacitidin.

Auch in diesem Fall decken sich die Ergebnisse mit der gesteigerten CxCr4- Expression auf der Oberfläche der Zellen.

## 6 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die gezielte Kombination von Wirkstoffen und deren unterschiedlichen Wirkungsweisen, den Schutz der hämatopoetischen Nische auf insbesondere die FLT3 ITD+ leukämischen Stammzellen zu überwinden bzw. zu reduzieren.

Hier bestand die Hoffnung neue Therapieoptionen für Patienten, welche an einer FLT3 ITD+ AML erkrankt sind, zu finden und somit die relativ schlechte Prognose dieser Erkrankung zu verbessern.

Damit dies geschehen kann, ging es zunächst darum zu zeigen, dass die in dieser Untersuchung verwendeten Medikamente - Azacitidin und Crenolanib - eine gezielte Wirkung auf die FLT3 ITD+ Zellen auslösen können und das möglichst ohne auch gesunde Zellen zu zerstören.

### **Crenolanib und Azacitidin vermindern die Vitalität von BaF3 FLT3 ITD+ Zellen in Monokultur**

In den hierzu durchgeführten Untersuchungen ergab sich, dass eine Behandlung, von mit einem FLT3 ITD-Vektor transfizierten BaF3-Zellen, mit Crenolanib zu einer deutlichen Reduktion der Vitalität der Zellen führt und Crenolanib somit als Wirkstoff in der gezielten Behandlung dieser Erkrankung gute Wirkungen zeigen könnte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der oben beschriebene Effekt nicht für Zellen ohne das FLT3 ITD-Gen reproduziert werden kann. Die Wirkung von Crenolanib ist hier also auf eine gezielte Wirkung gegen die Mutation und nicht auf dosisabhängige zytotoxische Effekte zurückzuführen.

Dass Crenolanib, wie auch andere Tyrosinkinaseinhibitoren, diese Wirkung aufweist, konnte bereits von Galanis et al. 2014 dargelegt werden. Sie finden daher auch heute schon Einsatz in Studien der modernen Therapie der AML. (Pemmaraju et al. 2014)

Für Azacitidin als Monotherapie konnten in dieser Arbeit ein dosisabhängiger zytotoxischer Effekt auf die behandelten Zellen gezeigt werden.

Chang et al. konnten zudem darlegen, dass die zytotoxische Wirkung von Tyrosinkinaseinhibitoren durch die Kombinationstherapie mit Azacitidin verstärkt wird. Auch in den Untersuchungen zu dieser Arbeit zeichnet sich ein Trend in diese Richtung ab. Hier konnte aber, eventuell auch auf Grund der statistisch betrachtet relativ geringen Fallzahl, kein signifikantes Ergebnis erzielt werden.

Für die Behandlung der FLT3+ AML zählt jedoch nicht nur, dass die verwendeten Wirkstoffe grundsätzlich die Fähigkeit besitzen die mutierten Zellen anzugreifen und abzutöten, sondern dass sie diese Wirkung auch im natürlichen Milieu unter dem Schutz der

Nische entfalten können. Um dies im Modell darstellen zu können, erfolgte zusätzlich die Kultivierung der transfizierten BaF3 Zellen mit EI08, welche die hämatopoetische Nische in vitro nachbilden. Hier zeigte sich in der Untersuchung der Vitalität der Zellen mittels Annexin/Pi-Färbung ein ähnlicher Effekt von Crenolanib und Azacitidin auf die mit der FLT3-Mutation versehenen Zellen, jedoch in geringerer Ausprägung.

Hier muss also der Schluss gezogen werden, dass es zumindest im Zellmodell, weder durch die alleinige Behandlung mit Crenolanib oder Azacitidin noch durch eine Kombination beider Wirkstoffe gelingt, den Schutz, welcher durch die Nische auf die leukämischen Stammzellen ausgeübt wird, vollständig zu überwinden. Es konnte jedoch demonstriert werden, dass die Kombination beider Wirkstoffe ein signifikant höheres Ansprechen als die Monotherapie mit einem der beiden Medikamente liefert.

### **Der Kontakt mit Stroma-Zellen führt bei BaF3-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellteilung**

Dass die Zellen der hämatopoetischen Nische eine wesentliche Aufgabe in der Entwicklung und dem Überleben von Stammzellen haben, konnte bereits von Calvi and Link 2015 dargelegt werden.

Im Rahmen der Untersuchungen für diese Arbeit fiel jedoch auch ein subjektiv verringertes Wachstum der BaF3 Zellen in Kontakt mit Stromazellen im Vergleich zu Zellen in Monokultur auf. Eine gezielte Untersuchung dieses Phänomens mittels Zellzählung nach 96 Stunden Zellkultur konnte hier signifikant zeigen, dass die Zellen, welche in Kontakt mit dem Stroma standen, eine verminderte Teilungsrate aufwiesen, während die Zellen in Monokultur im Durchschnitt die für BaF3-Zellen übliche Teilungszeit zeigten. Dieser Effekt war in den FLT3 ITD+ Zellen nochmals deutlicher zu erkennen als in den Zellen die den WT-Vektor trugen.

Es liegt also der Verdacht nahe, dass die Zellen in Kontakt mit EI08 in einen Zellzyklusarrest übergehen.

Dieser Effekt könnte insbesondere von klinischer Bedeutung sein, da die vollständige Wirkung der verwendeten Tyrosinkinaseinhibitoren nur bei aktivem Zellzyklus zum tragen kommt. Wenn die Stammzellen durch den Stromakontakt eine verminderte Aktivität aufweisen, wird dadurch also auch die Effektivität der verwendeten Medikamente reduziert.

### **Die Behandlung mit Crenolanib führt zu einem verstärkten Übertritt in die G2-M-Phase**

In den Untersuchungen konnte dargelegt werden, dass die Behandlung der ITD+ Zellen mit Crenolanib eine Veränderung des Zellzykluses bewirkt. Hier kommt es unter der Therapie zu einer signifikanten Verschiebung des Zellzykluses in Richtung G2-M-



Phase mit einem deutlichen Rückgang der Zellen, welche sich in der S-Phase befinden. Es scheint also so, dass die Therapie mit Crenolanib zu einer Blockade des Zellzykluses führt und somit zu einem Zellzyklusarrest der behandelten Zellen. Hierdurch kommt es zu einer wesentlichen Einschränkung der Zellen in ihrem Teilungs- und somit auch Vermehrungsverhalten.

Dieser Effekt ist dabei scheinbar vom Schutz der Nische unabhängig, da sich diese Verschiebung sowohl in Mono- als auch in Co-Kultur nachweisen lässt.

Dies steht im Kontrast zu den in der Zellzählung erhobenen Daten. Obwohl die Zellen durch den Stromakontakt eine geringere Zellteilungsrate aufweisen, scheint dies keinen Einfluss auf die Verteilung der Zellzyklusphasen zu haben. Erst durch die Therapie mit Crenolanib kommt es hier zu einer messbar Ausbildung eines Zellzyklusarrestes.

In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Crenolanib Einfluss auf die Stabilität des Aktin-Skeletts von Zellen nehmen kann (Berndsen et al. 2019; Konotop et al. 2016). Dies könnte eine Erklärung für die Ursache der Veränderungen innerhalb des Zellzykluses sein.

### **Crenolanib führt zu einer signifikanten Reduktion der Expression sowie der Phosphorylierung von FLT3.**

Nachdem die vorliegende Arbeit ergab, dass Crenolanib sowohl Einfluss auf die Vitalität als auch auf den Zellzyklus der behandelten FLT3-ITD+ BaF3 Zellen hat, folgte die Untersuchung des Einflusses auf den Signalweg selber. Hier zeigte sich, dass insbesondere Crenolanib zu einer verminderten Expression von FLT3 sowie dessen Phosphorylierung führt. Die verminderte Phosphorylierung ist aufgrund der chemischen Struktur und der damit verbundenen Wirkung als Tyrosinkinaseinhibitor von Crenolanib zu erwarten gewesen. Es kommt jedoch auch insgesamt zu einer Verminderung der FLT3-Expression und somit einem Rückgang der Rezeptoren in der Zellmembran.

Die Suppression der Expressierung und Aktivierung von FLT3 durch Crenolanib lässt sich hierbei sowohl in Monokultur als auch in Co-Kultur mit EI08 signifikant belegen.

Aufgrund der verminderten Aktivierung von FLT3 kommt es zudem es zu einer Reduktion der Phosphorylierung der nachgeschalteten Signalwege von Erk, Akt und STAT5. Hier scheint die Zelle jedoch kompensatorisch mit einer vermehrten Expression von Akt und Erk vor allem in der Co-Kultur gegenzusteuern.

Auch bei der Untersuchung des Signalweges zeigte sich hier, dass weder Crenolanib alleine noch in Kombination mit AZA die Stromaresistenz komplett überwinden kann. Auch lässt sich keine signifikante Wirkungsverstärkung durch die Kombination von Crenolanib und Azacitidin zeigen.

## **Azacitidin und Crenolanib führen zu einer verstärkten CxCr4 Expression**

Ein wichtiger Faktor, sowohl für den Schutz in der Nische als auch für das Migrationsvermögen der Zellen, stellt die Expression von CxCr4 auf der Oberfläche der Zellen dar. Daher erfolgte, zunächst im Zellmodell, die Untersuchung, wie sich die CxCr4-Expression durch die Behandlung mit Crenolanib und Azacitidin verhält.

Hier konnte, aufgrund fehlender Wiederholungen nicht signifikant, dargestellt werden, dass sowohl eine Behandlung mit Azacitidin als auch mit Crenolanib zu einer vermehrten Oberflächenexpression von CxCr4 führt. Dieser Effekt ist dabei sowohl in Mono- als auch in Co-Kultur mit E108 nachzuweisen.

## **Eine Behandlung mit Azacitidin oder Crenolanib führt zu einer vermehrten Migration der behandelten Zellen**

CxCr4 dient physiologisch als Rezeptor für CxCr12/SDF1alpha, welche wiederum entscheidend für die Migration von hämatopoetischen Zellen in die Blutlaufbahn sind. Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine Behandlung mit Azacitidin und Crenolanib zu einer verstärkten Expression dieses Rezeptors führt, wurde in diesem Rahmen außerdem gezeigt, dass sowohl für BaF3 Zellen mit WT- als auch mit FLT3 ITD Vektor, eine Behandlung mit Crenolanib bzw. Azacitidin zu einer signifikant verstärkten Migration der Zellen führt.

Insgesamt betrachtet war dieser Effekt bei den FLT3 ITD+ BaF3 Zellen deutlich stärker ausgeprägt.

Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu vorangegangenen Studien in denen gezeigt werden konnte, dass FLT3-ITD positiver AML über verschiedene Signalwege eine gesteigerte Migration aufweisen. (Ortlepp et al. 2013; Onishi et al. 2015)

Um diese Diskrepanz näher zu untersuchen wurden die beschriebenen Experimente mit Primärzellen wiederholt. Auch hier zeigte sich eine vermehrte CxCr4-Expression sowie eine gesteigerte Migration unter der Therapie mit Crenolanib.

Mit den vorliegenden Daten lässt sich jedoch keine abschließende Aussage darüber treffen, ob durch die Therapie eventuell eine ohnehin durch die FLT3-ITD Mutation ausgelöste gesteigerte Migration weiter gesteigert wurde. Hierfür müssten weitere Experimente, welche insbesondere auch Zellen aus gesundem Knochenmark enthalten durchgeführt und erneut analysiert werden.

## **Reproduktion der Ergebnisse in primären FLT3 ITD+ AML-Zellen**

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Behandlung mit Crenola-

nib und Azacitidin im Zellmodell zu einer verminderten Vitalität, einer signifikant verminderten Expression und Phosphorylierung von FLT3 und einer verstärkten Migration führt, galt es diese Ergebnisse an echten AML-Zellen, ebenfalls *in vitro*, zu überprüfen. Um die Ergebnisse möglichst vergleichbar zu machen, wurden die Versuche eins zu eins mit leukämischen Zellen, welche aus Knochenmarkspunktaten ersterkrankter Patienten stammen, wiederholt.

Vorweg ist zu sagen, dass über den Effekt von Crenolanib und Azacitidin auf die leukämische Zellen, in dieser Arbeit leider keine eindeutig belastbaren Ergebnisse erzielt werden konnten. Dies liegt unter anderem an der, mit der für  $n=3$ , recht geringen statistischen Aussagekraft. Aufgrund der geringen Zell- und Probenanzahl war eine höher Fallzahl leider nicht möglich. Zum anderen zeigten die einzelnen Patientenproben eine zum Teil deutliche Heterogenität in den Ergebnissen der Experimente. In allen in Primärmaterial durchgeführten Versuchen konnten jedoch zumindest deckungsgleiche Trends im Vergleich zu den Voruntersuchungen im Modellsystem dargestellt werden. Diese wiesen jedoch häufig keine klare Signifikanz auf.

Insgesamt muss gesagt werden, dass das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Analyse der Ergebnisse im BaF3-Zellmodell gelegen hat. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte, sowohl *in vitro* als auch im Xenograft Mausmodell, gezeigt werden, dass in primären Zellen die Kombination von Crenolanib und Azacitidin den Stromaschutz wirksam aufheben kann und die verbleibenden leukämischen Stammzellen unterdrückt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die parallel zu FLT3-ITD auftretenden Mutationen eine wesentliche Auswirkung auf diesen Effekt haben. (Garz et al. 2017)

### **Crenolanib erhöht die Expression von FLT3, STAT5, Akt und Erk in Primärmaterial**

In der für die primären Zellen durchgeführten Untersuchung des FLT3-Signalwegs sowie den daran angeschlossenen Signalwegen ergab sich, dass insbesondere die Therapie mit Crenolanib zu einer gesteigerten Synthese aller untersuchten Proteine führt. Dieser Effekt ist insbesondere in Co-Kultur mit E108 zu beobachten.

Eine Reduktion der Aktivierung bzw. der Phosphorylierung konnte hier jedoch nur in sehr geringer Form erreicht werden.

Insbesondere bei FLT3 und Akt kam es in der Co-Kultur zu einer Steigerung der Aktivität.

Eine Reduktion der Phosphorylierung von FLT3 und Erk unter der Behandlung mit Crenolanib ließ sich lediglich in der Monokultur darstellen.

*In vitro* ließ sich in den Experimenten für die Co-Kultur keine signifikante Hemmung des FLT3 Signalwegs nachweisen. Dies gilt dabei sowohl für die Therapie mit Azacitidin und

Crenolanib als auch für die Kombination beider Wirkstoffe.

### **Weder Crenolanib noch Azacitidin oder die Kombination aus beiden Wirkstoffen führen zu einem vollständigen Überwinden des Stromaschutzes**

Insgesamt betrachtet lässt sich sagen, dass weder die Therapie mit Azacitidin und Crenolanib alleine noch die Kombination beider Wirkstoffe die schützende Funktion des Stromas im Zellmodell mit BaF3-Zellen vollständig überwinden konnte.

Durch Garz et al. 2017 ließ sich jedoch ein, wenn auch von anderen vorliegenden Mutationen beeinflusster, synergistischer Effekt bei der Durchbrechung der Stromaresistenz zeigen.

Es ist also zu vermuten, dass eine vollständige Eradikation der leukämischen Stammzellen mit dieser Therapie auch in vivo möglich, aber abhängig vom Vorliegen anderer Mutationen ist.

Insgesamt ergaben sich für das Zellmodell in dieser Arbeit kaum Unterschiede zwischen der Monotherapie mit Crenolanib und der Kombinationstherapie mit Azacitidin und Crenolanib.

Wie zu erwarten war, brachte eine Therapie mit Azacitidin alleine wenig Einfluss auf die Regulation der untersuchten Signalwege FLT3, STAT5, Akt und Erk. Aber auch das Zellüberleben wurde durch Azacitidin alleine nur wenig beeinflusst.

Es gibt jedoch deutliche Hinweise darauf, dass die Kombinationstherapie es vermag die Anzahl an vitalen leukämischen Zellen zu reduzieren, auch wenn die in dieser Arbeit gewonnenen Daten hier keine signifikanten Ergebnisse aufwiesen.

Diese Ergebnisse sollten jedoch in dem Zusammenhang der einzeln untersuchten FLT3-ITD-Mutation gesehen werden. Da es sich bei BaF3 um eine Mauszelllinie handelt, in die isoliert der FLT3-Vektor eingebracht wurde, lassen sich Wechselwirkungen mit anderen Mutationen, welche im Patienten häufig parallel auftreten (z.B. DNMT3A und NPM1), hier nicht darstellen. Sie bilden also lediglich einen Teilaspekt in der Betrachtung der FLT3-ITD positiven AML ab.

### **Sowohl Crenolanib als auch Azacitidin führen zu einem vermehrten Einbau von CxCr4 in die Zelloberfläche**

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit beiden Wirkstoffen, sowohl in der alleinigen als auch in der Kombinationstherapie, zu einer vermehrten CxCr4-Expression und im Zuge dessen auch zu einer erhöhten Migration führen.

Dies könnte in vivo ein vermehrtes Ausschwemmen der leukämischen Zellen aus dem Knochenmark in die Blutbahn und somit in die Peripherie bedeuten. Hierbei würde es für die ausgeschwemmten Zellen zu einem Verlust des Schutzes durch das Stroma der häma-

topoetischen Nische kommen.

Dies könnte dann, wie vor allem in unseren Untersuchungen im Zellmodell beobachtet, Crenolanib eine deutlich bessere Angriffsmöglichkeit bieten. Denn wie in dieser Arbeit im Zellmodell gezeigt werden konnte, kann sowohl die Therapie mit Crenolanib als auch die Kombination mit Azacitidin ohne den Schutz der Nische deutlich größere Erfolge in der Reduktion der Vitalität verzeichnen.

Ob die Behandlung auch in vivo zu einer verstärkten Migration führt, muss jedoch in folgenden Arbeiten untersucht werden. Zudem ist zu klären, welchen Einfluss die Therapie auf die Zellen der Stammzellnische hat. Gerade hier befinden sich viele Zellen, welche den Chemokinliganden CxCR12 aufweisen, in direkter Nähe zu den hämatopoetischen Stammzellen (Sugiyama et al. 2016). Ob diese ein Ausschwemmen der Zellen in die Blutbahn unterbinden, kann in den hier durchgeführten Experimenten nicht eruiert werden.

### **Technische und statistische Limitierungen der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit hat versucht innerhalb eines Zellmodells die Mechanismen und die Wirkungsweise von Crenolanib und Azacitidin auf leukämische Zellen mit einer FLT3 ITD-Mutation darzustellen und zu untersuchen.

Bei diesem Vorgehen muss natürlich immer bedacht werden, dass es sich um ein Modell handelt und nicht alle in vivo herrschenden Bedingungen eins zu eins nachgestellt und berücksichtigt werden können. Zwar wurde mit den BaF3 Zellen ein bereits gut untersuchtes Zellmodell der AML verwendet (Warmuth et al. 2007), trotz allem kann ein solches Modell immer nur Hinweise auf die Grundmechanismen geben. Dies gilt im speziellen Fall besonders, da es sich bei den BaF3-Zellen nicht nur um eine murine Zelllinie, sondern insbesondere auch um eine B-Zelllinie handelt. Sie dient als gutes Modell für die Untersuchung einer FLT3-ITD positiven AML, kann jedoch nicht die Effekte anderer Mutationen oder deren Interaktion mit FLT3 darstellen. Hier liegt eine der offensichtlichen Begrenzungen des Modells, da die FLT3-ITD positive AML im Menschen deutlich komplexer ist.

Auch die Verwendung von Patientenproben in Verbindung mit den EI08 Zellen stellt ein Modellsystem dar. Zwar konnte von Oostendorp et al. gezeigt werden, dass diese Zellen eine schützende und unterstützende Wirkung auf hämatopoetische Stammzellen aufweisen (Oostendorp et al. 2002), die genaue Zusammensetzung und Funktion der Nische ist aber weiterhin ungeklärt.

Gerade hier werden in vielen Studien derzeit neue Erkenntnisse gewonnen.

Durch die oben genannten Limitierungen eignet sich das BaF3-Zellmodell zwar gut zur Untersuchung der FLT3-ITD spezifischen Signalwege, zeigt aber Einschränkungen in der Untersuchung der Interaktion mit der Nische. Daher wäre es als ein nächster Schritt sinnvoll weitere Untersuchungen auch in vivo und mit Zellen, die nicht nur eine isolierte

Mutation aufweisen, durchzuführen. So konnte in unserer Forschungsgruppe bereits in einem ergänzenden Projekt in PDX-Mäusen gezeigt werden, dass die Behandlung von FLT3-ITD positiven AML-Zellen mit einer Kombination von Crenolanib und Azacitidin zu einer Reduktion des Stromaschutzes führt. (Garz et al. 2017)

Auch wurde in dieser Arbeit gezielt die FLT3 ITD-Mutation untersucht. Viele an akuter myeloischer Leukämie erkrankter Patienten weisen jedoch zusätzlich weitere, ebenfalls prognostisch relevante, Mutationen auf (Papaemmanuil et al. 2016). Inwieweit diese die Effekte von Crenolanib und Azacitidin verändern, konnte hier nicht dargestellt werden. Auch hier wäre eine genauere Untersuchung in vivo interessant.

Zuletzt lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit insbesondere für alle Versuche mit Primärmaterialien zwar Trends zu erkennen gewesen sind, welche sich auch mit den Voruntersuchungen im BaF3 Zellmodell decken, diese aber häufig statistisch keine Signifikanz aufwiesen.

Hier ist am ehesten die relativ geringe Fallzahl zu benennen, welche die fehlende Signifikanz mit begünstigt hat. Schon bei dieser recht geringen Anzahl an Proben lies sich ein leicht unterschiedliches Verhalten der Zellen unter der Behandlung erkennen. Auf Grund der geringen Zell- und Probenzahl sowie der zeitlichen Limitierung war es hier leider nicht möglich, noch weitere Experimente durchzuführen. Es ist allerdings zu erwarten, dass es bei einer höheren Fallzahl zu einer signifikante Darstellung der zu beobachteten Ergebnisse kommen würde.

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte bereits an Hand von Xenographmäusen sowie an primären leukämischen Stammzellen in vitro Daten erhoben werden, welche eine Überwindung der Stromaresistenz im Rahmen einer kombinierten Therapie mit Crenolanib und Azacitidin darstellen. (Garz et al. 2017)

Eine weitere Untersuchung der spezifischen FLT3 Signalwege könnte zudem interessante Ergebnisse zeigen.

## 7 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie ist aufgrund ihrer weiterhin insgesamt schlechten Prognose und dem dringenden Bedarf nach besseren Therapieoptionen auch nach vielen Jahren Bestandteil eines großen Forschungsgebietes. Auch die Funktion der hämatopoetischen Nische und dem damit verbundenen Schutz der leukämischen Stammzellen im Knochenmark ist weiterhin Bestandteil von Untersuchungen. Viele Fragen sind jedoch noch nicht beantwortet. Auch deshalb ist die Therapie der AML in den letzten Jahren weitestgehend unverändert.

Gerade AML-Patienten mit speziellen Mutationen, wie der FLT3-Mutation welche bei ca. 30% aller Patienten gefunden wird, haben daher leider immer noch eine schlechte Prognose. Dies liegt vor allem daran, dass es meist mit den aktuell verwendeten Therapien zu keiner langfristigen Remission kommt, da eine vollständige Eradikation der leukämischen Stammzellen nicht gelingt.

In den letzten Jahren fanden immer mehr unterstützende Substanzen sowie Biologika Verwendung in der Leukämietherapie. Hierzu gehören auch der Tyrosinkinaseinhibitor Crenolanib und das Cytosinanalogen Azacitidin, welche in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht wurden. Aber auch diese konnten in der alleinigen Therapie bisher keinen durchschlagenden Erfolg erzielen.

Dies ist unter anderem durch den Schutz der hämatopoetischen Nische auf die leukämischen Stammzellen zu erklären, welche durch die bisher verwendeten Therapien nicht vollständig vernichtet werden können und daher zu Rückfällen führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Zellmodellen sowie mittels CD34+/CD38- Zellen, aus dem Knochenmark erkrankter Patienten, untersucht inwieweit eine Kombination von Crenolanib und Azacitidin sich auf das Überleben der hämatopoetischen Stammzellen ausübt und ob es dadurch möglich ist, den Schutz der Nische zu überwinden.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl Crenolanib als auch Azacitidin sowie die Kombination von beiden zu einer signifikanten Reduktion der Vitalität der mutierten Zellen führt. Bei Zellen, die unter dem Schutz der Nische stehen, konnte jedoch auch die Kombinationstherapie nicht zu einer kompletten Eradikation der Zellen führen. Zudem führte die Behandlung mit beiden Substanzen zu einer signifikanten Zunahme der Migration der behandelten Zellen.

Inwieweit diese Effekt auch in vivo nachzuweisen ist müsste jedoch mittels weiterer Untersuchungen bestätigt werden. Auch den Einfluss der Medikamente auf den Zellzyklus der leukämischen Stammzellen könnte in weiteren Experimenten untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination aus Crenolanib und Azacitidin es im Zellmodell nicht vermag den Schutz des Stromas gegenüber den LSC komplett zu überwinden. Es deutet jedoch vieles daraufhin, dass die beiden Substanzen als supportive Maßnahme zu einem verbesserten Outcome führen können. Daher sollte ein therapeutischer Einsatz beider Substanzen auch im Bezug auf die Mobilisation und damit bessere Angreifbarkeit der LSC bedacht werden.



## 8 Anhang

### Tabellenverzeichnis

1	WHO Klassifikation 2016 (Döhner et al. 2017) . . . . .	8
2	ELN Risikoklassifikation 2017 (Döhner et al. 2017) . . . . .	9
3	Suspensionszelllinien . . . . .	21
4	Adhärenzte Zelllinien . . . . .	21
5	AML FLT3-ITD positive Patientenproben . . . . .	21
6	Medikamente . . . . .	22
7	Chemikalien . . . . .	23
8	Geräte . . . . .	25
9	Primäre Antikörper . . . . .	25
10	Sekundäre Antikörper . . . . .	26
11	FACS Antikörper . . . . .	26
12	Software . . . . .	26
13	Amido black stain . . . . .	27
14	Annexin/Pi Puffer . . . . .	27
15	HF2+ Puffer . . . . .	27
16	1x Lysis Puffer . . . . .	28
17	5x Lysis Puffer . . . . .	28
18	2x Protein-Loading Buffer (LB) . . . . .	29
19	10x Running-Buffer . . . . .	29
20	10x TBS . . . . .	29
21	Transferpuffer . . . . .	30
22	BaF3-Medium . . . . .	30
23	Stroma-Medium . . . . .	30
24	Freeze-Medium . . . . .	31
25	Gelatine 0.1% . . . . .	31

## Abbildungsverzeichnis

1	<b>Die physiologische Hämatopoese</b> aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (modifiziert nach dem Kompetenznetz Leukämien) . . .	5
2	<b>Model der Entstehung einer FLT3 ITD+ AML Mutationen</b> , in der epigenetischen Regulation, können dafür verantwortlich sein, dass aus einer hämatopoetischen Stammzelle (HSC) eine pre-leukämische Stammzelle entsteht. Diese können sich weiterhin vermehren und in physiologische Blutzellen entwickeln und sind daher klinisch unauffällig. Das Auftreten weiterer Mutationen, zum Beispiel im FLT3-Gen können dann jedoch zur Entstehung einer leukämischen Stammzelle führen. Die so veränderten Stammzellen beginnen sich unkontrolliert zu proliferieren und eine Vielzahl unreifer myeloider Blasten zu bilden. (nach Garz, 2017c). . . . .	13
3	<b>Aufbau des FLT3 Gens mit häufigen Mutationloci</b> Interne Tandemmutationen befinden sich im Bereich der juxtamembranösen Domain bzw. in der Tyrosinkinase Domain 1. (nach Janke et al. 2014) . . . . .	14
4	<b>Aufbau des FLT3 Rezeptors. a) inaktive Form, b) durch den FLT3 Liganden (FL) aktivierte Form.</b> Der FLT3-Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Domäne, welche für die Bindung des FL-Liganden verantwortlich ist; der transmembranösen Domain (TM), welche den Rezeptor in der Plasmamembran verankert; der juxtamembranösen Domain (JM), in welcher viele der für die FLT3 ITD+ AML typische Mutationen sitzen sowie zwei Tyrosinkinase-Domains (TK1 und TK2). Kommt es zur Bindung des FL-Liganden führt eine Konformationsänderung des Rezeptors zu dessen Aktivierung. (Nach Grafone et al. 2012) . . . . .	14
5	<b>Darstellung des FLT3 Signalwegs und die über die Modulation von STAT5, Akt und Erk gesteuerten Funktionen der Zelle</b> . . . . .	15
6	<b>Strukturformel von Crenolanib</b> . . . . .	16
7	<b>Strukturformel von Azacitidin</b> . . . . .	17
8	<b>Migrationsassay mithilfe von speziellen Migrationswells.</b> . . . . .	36
9	<b>Histogramm der Oberflächenfärbung des CD135-(FLT-3-)Rezeptors auf BaF3-ITD- und WT-Zellen zur Kontrolle der Transfektion</b> Dargestellt ist sowohl die Isotyp-Kontrolle als auch das dazu deutlich nach rechts verschobene FLT3 Signal. n=1 . . . . .	37
10	<b>Vitalität von BaF3 Zellen unter verschiedenen Konzentrationen Crenolanib</b> MTT Assay nach 96 Stunden Behandlung mit Crenolanib. n=3 ± SEM, angegeben sind die Signifikanzen im Bezug auf die Vitalität der unbehandelten Zellen . . . . .	38

11	<b>Dosisabhängige Zytotoxizität auf BaF3 Zellen bei Behandlung mit Crenolanib</b> Die Vitalität der Zellen wurde mittels AnnexinV/Pi Durchflusszytometrie, bei Crenolanibkonzentrationen von 0 bis 100nm, nach 24-96 Stunden bestimmt, n=3 ± SEM . . . . .	39
12	<b>Wirkung von verschiedenen Crenolanibkonzentrationen auf den FLT3-3- und nachgeschaltete Signalwege</b> Westernblot zur Darstellung des FLT3-, STAT5-, Akt- und Erk-Signalweg in FLT3-ITD transfizierten BaF3-Zellen nach der Behandlung mit Crenolanib in Konzentrationen von 0 bis 100nM für 24 Stunden, n=3 ± SEM . . . . .	40
13	<b>Vitalität von BaF3 Zellen unter verschiedenen Konzentrationen Azacitidin</b> Die dosisabhängige Zytotoxizität wurde nach 96 Stunden Azacitidin Behandlung mittels MTT Assay bestimmt. n=3 ± SEM, angegeben sind die Signifikanzen im Bezug auf die Vitalität der unbehandelten .	41
14	<b>Proliferation von BaF3-ITD- und WT-Zellen in Suspensionskultur bzw. in Co-Kultur auf El08</b> Die Kultivierung der BaF3-Zellen erfolgte in Suspension bzw. auf El08 für 24 und 96 Stunden. Jeweils mit und ohne IL3 Behandlung, n=3 ± SEM . . . . .	42
15	<b>Annexin/Pi-FACS Analyse zur Wirkung von Crenolanib und Azacitidin auf BaF3 FLT3-ITD+ Zellen in Suspensions- und Co-Kultur mit El08</b> a) Exemplarische Darstellung der FACS Analyse; b) statistische Erhebung zum Überleben der BaF3 FLT3-ITD+ Zellen unter der Behandlung mit DMSO, Crenolanib (100nM), Azacitidin (100nM) oder einer Kombination aus Crenolanib und Azacitidin für 24 Stunden, n=3 ± SEM . . . . .	44
16	<b>Wirkung von Crenolanib und Azacitidin auf den FLT3-Signalweg</b> Western Blot von BaF3 FLT3 ITD Zellen in Suspensions- und Co-Kultur mit El08 nach Behandlung mit DMSO, Crenolanib (100nM), Azacitidin (100nM) oder einer Kombination aus Crenolanib und Azacitidin für 24 Stunden . . . . .	45
17	<b>Wirkung von Crenolanib und Azacitidin auf den FLT3-Signalweg</b> Statistische Auswertung von Western Blots mit BaF3 FLT3 ITD Zellen in Suspensions- und in Co-Kultur mit El08 nach Behandlung mit DMSO, Crenolanib (100nM), Azacitidin (100nM) oder einer Kombination aus Crenolanib und Azacitidin für 24 Stunden. n=3 ± SEM . . . . .	46
18	<b>Zellzyklusanalyse mittels BrdU Assay</b> a) Statistische Auswertung des BrdU Assays von BaF3-FLT3-ITD in Suspensionskultur bzw. Co-Kultur mit El08 nach der Behandlung mit DMSO, Azacitidin (100M), Crenolanib (100nM) oder der Kombination aus Azacitidin und Crenolanib für 24 Stunden, n=3 ± SEM b) Exemplarische Darstellung der FACS Ergebnisse am Beispiel der BaF3-ITD+ Co-Kultur . . . . .	47

19	<b>CxCr4 Expressionsmessung auf BaF3-ITD- und -WT-Zellen</b> Die BaF3-Zellen wurden 24 Stunden mit DMSO, Crenolanib (100nM), Azacitidin (100nM) und der Kombination aus Crenolanib und Azacitidin behandelt. Danach erfolgte die Oberflächenfärbung auf CxCr4 mit anschließender FACS Analyse. n=1 . . . . .	49
20	<b>Messung der Migration von BaF3-Zellen nach der Behandlung mit Azacitidin (100nM), Crenolanib (100nM) und der Kombination aus Beidem</b> Nach der 24-stündigen Behandlung wurde die Migration der Zellen in Verbindung mit SDF1alpha in speziellen Migrationswells gemessen. n=3 ± SEM . . . . .	50
21	<b>Wirkung von Crenolanib und Azacitidin auf den FLT3-Signalweg in CD34+ FLT3+ Zellen</b> Statistische Auswertung von Western Blots aus FLT3-ITD positiven Patientenproben in Suspensions- und Co-Kultur mit EI08 nach der Behandlung mit DMSO, Crenolanib (100nM), Azacitidin (100nM) oder einer Kombination aus Crenolanib und Azacitidin für 24 Stunden. n=3 ± SEM . . . . .	51
22	<b>CxCr4 Messung auf CD34+ CD38- Zellen aus FLT3-ITD+Patientenproben</b> Die CD34+/CD38- Zellen wurden 24 Stunden mit DMSO, Crenolanib (100nM), Azacitidin (100nM) und der Kombination aus Crenolanib und Azacitidin behandelt. Danach erfolgte die Oberflächenfärbung auf CxCr4 mit anschließender FACS-Analyse. n=3 ± SEM . . . . .	52
23	<b>Messung der Migration von CD34+ CD38- Zellen aus FLT3 ITD+ Primär-material</b> Durchführung eines vier-stündigen Migrationsassays nach der Behandlung mit Azacitidin (100nM), Crenolanib (100nM) und der Kombination aus Beiden nach 24 Stunden auf einer Co-Kultur mit EI08. n=3 ± SEM . . . . .	53

## 9 Danksagung

Als Erstes möchte ich meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Katharina Götze dafür danken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe schreiben zu dürfen sowie für die Unterstützung und die vielen guten Ratschläge während der letzten Jahre.

Zudem möchte ich mich bei Ingo Ringshausen dafür bedanken, dass er sich dazu bereit erklärt hat meine Arbeit mitzubetreuen.

Ein weiterer Dank geht an Anne-Kathrin Garz sowie Marie-Theresa Weickert, welche mir bei jeglichen theoretischen und praktischen Fragen zur Seite standen und mich jederzeit unterstützt und mit neuen Ideen versorgt haben.

Auch möchte ich dem gesamten Labor für die Unterstützung und jederzeit freundliche Atmosphäre danken.

Ein besonders großer Dank geht zudem an meine Freunde - insbesondere Louisa Nerl - für viele Stunden von Diskussionen und dem Zusprechen von Mut sowie meiner Familie Susanne Wolf, Rüdiger Wolf, Alexa Wolf, Horst Franzbach und Heidi Franzbach. Ich möchte mich für eure Liebe, Unterstützung und Motivation in den letzten Jahren bedanken.

## Literatur

- Adams, J. A. (2003), 'Activation loop phosphorylation and catalysis in protein kinases: is there functional evidence for the autoinhibitor model?', *Biochemistry* **42**(3), 601–607.
- Aimiwu, J., Wang, H., Chen, P., Xie, Z., Wang, J., Liu, S., Klisovic, R., Mims, A., Blum, W., Marcucci, G. & Chan, K. K. (2012), 'Rna-dependent inhibition of ribonucleotide reductase is a major pathway for 5-azacytidine activity in acute myeloid leukemia', *Blood* **119**(22), 5229–5238.
- Ballaschk, A. (2014), Identifikation und funktionelle Charakterisierung von Internen Tandemduplikationen des FLT3-Rezeptors bei akuter myeloischer Leukämie, Magdeburg, universität, diss., 2014, Universitätsbibliothek, Magdeburg.
- Bernardini, G., Sciumè, G., Bosisio, D., Morrone, S., Sozzani, S. & Santoni, A. (2008), 'Ccl3 and cxcl12 regulate trafficking of mouse bone marrow nk cell subsets', *Blood* **111**(7), 3626–3634.
- Berndsen, R. H., Castrogiovanni, C., Weiss, A., Rausch, M., Dallinga, M. G., Miljkovic-Licina, M., Klaassen, I., Meraldi, P., van Beijnum, J. R. & Nowak-Sliwinska, P. (2019), 'Anti-angiogenic effects of crenolanib are mediated by mitotic modulation independently of pdgfr expression', *British journal of cancer* **121**(2), 139–149.
- Bhullar, K. S., Lagarón, N. O., McGowan, E. M., Parmar, I., Jha, A., Hubbard, B. P. & Rupasinghe, H. P. V. (2018), 'Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions', *Molecular cancer* **17**(1), 48.
- Brandts, C. H., Sargin, B., Rode, M., Biermann, C., Lindtner, B., Schwäble, J., Buerger, H., Müller-Tidow, C., Choudhary, C., McMahon, M., Berdel, W. E. & Serve, H. (2005), 'Constitutive activation of akt by flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation', *Cancer research* **65**(21), 9643–9650.
- Breitenbuecher, F., Schnittger, S., Grundler, R., Markova, B., Carius, B., Brecht, A., Duyster, J., Haferlach, T., Huber, C. & Fischer, T. (2009), 'Identification of a novel type of itd mutations located in nonjuxtamembrane domains of the flt3 tyrosine kinase receptor', *Blood* **113**(17), 4074–4077.
- Busillo, J. M. & Benovic, J. L. (2007), 'Regulation of cxcr4 signaling', *Biochimica et biophysica acta* **1768**(4), 952–963.
- Calvi, L. M. & Link, D. C. (2015), 'The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease', *Blood* **126**(22), 2443–2451.

- Chang, E., Ganguly, S., Rajkhowa, T., Gocke, C. D., Levis, M. & Konig, H. (2016), 'The combination of flt3 and dna methyltransferase inhibition is synergistically cytotoxic to flt3/itd acute myeloid leukemia cells', *Leukemia* **30**(5), 1025–1032.
- Cheson, B. D., Cassileth, P. A., Head, D. R., Schiffer, C. A., Bennett, J. M., Bloomfield, C. D., Brunning, R., Gale, R. P., Grever, M. R. & Keating, M. J. (1990), 'Report of the national cancer institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **8**(5), 813–819.
- Choudhary, C., Brandts, C., Schwable, J., Tickenbrock, L., Sargin, B., Ueker, A., Böhmer, F.-D., Berdel, W. E., Müller-Tidow, C. & Serve, H. (2007), 'Activation mechanisms of stat5 by oncogenic flt3-itd', *Blood* **110**(1), 370–374.
- Cornelissen, J. J. & Blaise, D. (2016), 'Hematopoietic stem cell transplantation for patients with aml in first complete remission', *Blood* **127**(1), 62–70.
- Creutzig, U., van den Heuvel-Eibrink, M. M., Gibson, B., Dworzak, M. N., Adachi, S., de Bont, E., Harbott, J., Hasle, H., Johnston, D., Kinoshita, A., Lehrnbecher, T., Leverger, G., Mejstrikova, E., Meshinchi, S., Pession, A., Raimondi, S. C., Sung, L., Sary, J., Zwaan, C. M., Kaspers, G. J. L. & Reinhardt, D. (2012), 'Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel', *Blood* **120**(16), 3187–3205.
- Debierre-Grockiego, F. (2004), 'Anti-apoptotic role of stat5 in haematopoietic cells and in the pathogenesis of malignancies', *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **9**(6), 717–728.
- Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Larson, R. A., Levine, R. L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M. S., Tien, H.-F., Wei, A. H., Löwenberg, B. & Bloomfield, C. D. (2017), 'Diagnosis and management of aml in adults: 2017 eln recommendations from an international expert panel', *Blood* **129**(4), 424–447.
- Dombret, H., Seymour, J. F., Butrym, A., Wierzbowska, A., Selleslag, D., Jang, J. H., Kumar, R., Cavenagh, J., Schuh, A. C., Candoni, A., Récher, C., Sandhu, I., Bernal del Castillo, T., Al-Ali, H. K., Martinelli, G., Falantes, J., Noppeney, R., Stone, R. M., Minden, M. D., McIntyre, H., Songer, S., Lucy, L. M., Beach, C. L. & Döhner, H. (2015), 'International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed aml with 30% blasts', *Blood* **126**(3), 291–299.
- Fenaux, P., Mufti, G. J., Hellström-Lindberg, E., Santini, V., Gattermann, N., Germing, U., Sanz, G., List, A. F., Gore, S., Seymour, J. F., Dombret, H., Backstrom, J., Zimmerman, L., McKenzie, D., Beach, C. L. & Silverman, L. R. (2010), 'Azacitidine

- prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**(4), 562–569.
- Fuchs, E., Tumber, T. & Guasch, G. (2004), 'Socializing with the neighbors', *Cell* **116**(6), 769–778.
- Fukuda, S., Broxmeyer, H. E. & Pelus, L. M. (2005), 'Flt3 ligand and the flt3 receptor regulate hematopoietic cell migration by modulating the sdf-1alpha(cxcl12)/cxcr4 axis', *Blood* **105**(8), 3117–3126.
- Galanis, A., Ma, H., Rajkhowa, T., Ramachandran, A., Small, D., Cortes, J. & Levis, M. (2014), 'Crenolanib is a potent inhibitor of flt3 with activity against resistance-conferring point mutants', *Blood* **123**(1), 94–100.
- Garz, A.-K. (2017), 'Azacitidine combined with crenolanib abrogates niche protection and expansion of residual leukemic stem cells (lsc) in flt3-itd+ acute myeloid leukemia (aml) with concurrent gene mutations in npm1, dnmt3a or tet2', *E-Journal Menara Perkebunan* (1).
- Garz, A.-K., Wolf, S., Grath, S., Gaidzik, V., Habringer, S., Vick, B., Rudelius, M., Ziegenhain, C., Herold, S., Weickert, M.-T., Smets, M., Peschel, C., Oostendorp, R. A. J., Bultmann, S., Jeremias, I., Thiede, C., Döhner, K., Keller, U. & Götze, K. S. (2017), 'Azacitidine combined with the selective flt3 kinase inhibitor crenolanib disrupts stromal protection and inhibits expansion of residual leukemia-initiating cells in flt3-itd aml with concurrent epigenetic mutations', *Oncotarget* **8**(65), 108738–108759.
- Gilliland, D. G. & Griffin, J. D. (2002), 'The roles of flt3 in hematopoiesis and leukemia', *Blood* **100**(5), 1532–1542.
- Grafone, T., Palmisano, M., Nicci, C. & Storti, S. (2012), 'An overview on the role of flt3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment', *Oncology reviews* **6**(1), e8.
- Hennighausen, L. & Robinson, G. W. (2008), 'Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors stat5a and stat5b', *Genes & development* **22**(6), 711–721.
- Hino, O. & Kobayashi, T. (2017), 'Mourning dr. alfred g. knudson: the two-hit hypothesis, tumor suppressor genes, and the tuberous sclerosis complex', *Cancer science* **108**(1), 5–11.
- Hubbard, S. R. (1999), 'Structural analysis of receptor tyrosine kinases', *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **71**(3-4), 343–358.



- Janke, H., Pastore, F., Schumacher, D., Herold, T., Hopfner, K.-P., Schneider, S., Berdel, W. E., Büchner, T., Woermann, B. J., Subklewe, M., Bohlander, S. K., Hiddemann, W., Spiekermann, K. & Polzer, H. (2014), 'Activating flt3 mutants show distinct gain-of-function phenotypes in vitro and a characteristic signaling pathway profile associated with prognosis in acute myeloid leukemia', *PLoS one* **9**(3), e89560.
- Jones, P. A. & Taylor, S. M. (1980), 'Cellular differentiation, cytidine analogs and dna methylation', *Cell* **20**(1), 85–93.
- Kelly, L. M., Liu, Q., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L. & Gilliland, D. G. (2002), 'Flt3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model', *Blood* **99**(1), 310–318.
- Khwaja, A., Bjorkholm, M., Gale, R. E., Levine, R. L., Jordan, C. T., Ehninger, G., Bloomfield, C. D., Estey, E., Burnett, A., Cornelissen, J. J., Scheinberg, D. A., Bouscary, D. & Linch, D. C. (2016), 'Acute myeloid leukaemia', *Nature reviews. Disease primers* **2**, 16010.
- Kiel, M. J., Yilmaz, O. H., Iwashita, T., Yilmaz, O. H., Terhorst, C. & Morrison, S. J. (2005), 'Slam family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells', *Cell* **121**(7), 1109–1121.
- Kindler, T., Lipka, D. B. & Fischer, T. (2010), 'Flt3 as a therapeutic target in aml: still challenging after all these years', *Blood* **116**(24), 5089–5102.
- Knudson, JR, A. G. (1971), 'Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**(4), 820–823.
- Konotop, G., Bausch, E., Nagai, T., Turchinovich, A., Becker, N., Benner, A., Boutros, M., Mizuno, K., Krämer, A. & Raab, M. S. (2016), 'Pharmacological inhibition of centrosome clustering by slingshot-mediated cofilin activation and actin cortex destabilization', *Cancer research* **76**(22), 6690–6700.
- Li, L. H., Olin, E. J., Buskirk, H. H. & Reineke, L. M. (1970), 'Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on 11210 leukemia', *Cancer research* **30**(11), 2760–2769.
- Lindsley, R. C., Mar, B. G., Mazzola, E., Grauman, P. V., Shareef, S., Allen, S. L., Pigneux, A., Wetzler, M., Stuart, R. K., Erba, H. P., Damon, L. E., Powell, B. L., Lindeman, N., Steensma, D. P., Wadleigh, M., DeAngelo, D. J., Neuberg, D., Stone, R. M. & Ebert, B. L. (2015), 'Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations', *Blood* **125**(9), 1367–1376.
- Lyman, S. D. (1995), 'Biology of flt3 ligand and receptor', *International journal of hematology* **62**(2), 63–73.

- Manning, B. D. & Toker, A. (2017), 'Akt/pkb signaling: Navigating the network', *Cell* **169**(3), 381–405.
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Bassecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M. & Franklin, R. A. (2006), 'Roles of the raf/mek/erk pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance', *Biochimica et biophysica acta* **1773**(8), 1263–1284.
- Mizuki, M., Schwable, J., Steur, C., Choudhary, C., Agrawal, S., Sargin, B., Steffen, B., Matsumura, I., Kanakura, Y., Böhmer, F. D., Müller-Tidow, C., Berdel, W. E. & Serve, H. (2003), 'Suppression of myeloid transcription factors and induction of stat response genes by aml-specific flt3 mutations', *Blood* **101**(8), 3164–3173.
- Montesano, A., Luzi, L., Senesi, P. & Terruzzi, I. (2013), 'Modulation of cell cycle progression by 5-azacytidine is associated with early myogenesis induction in murine myoblasts', *International journal of biological sciences* **9**(4), 391–402.
- Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hébert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J. & Power, C. A. (2000), 'International union of pharmacology. xxii. nomenclature for chemokine receptors', *Pharmacological reviews* **52**(1), 145–176.
- Nakao, M., Janssen, J. W., Erz, D., Seriu, T. & Bartram, C. R. (2000), 'Tandem duplication of the flt3 gene in acute lymphoblastic leukemia: a marker for the monitoring of minimal residual disease', *Leukemia* **14**(3), 522–524.
- Nilsson, S. K., Johnston, H. M. & Coverdale, J. A. (2001), 'Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches', *Blood* **97**(8), 2293–2299.
- Onishi, C., Mori-Kimachi, S., Hirade, T., Abe, M., Taketani, T., Suzumiya, J., Sugimoto, T., Yamaguchi, S., Kapur, R. & Fukuda, S. (2015), 'Internal tandem duplication mutations in flt3 gene augment chemotaxis to cxcl12 protein by blocking the down-regulation of rho-associated kinase via the cxcl12/cxcr4 signaling axis', *The Journal of biological chemistry* **290**(47), 28356.
- Oostendorp, R. A. J., Harvey, K. N., Kusadasi, N., de Bruijn, Marella F. T. R., Saris, C., Ploemacher, R. E., Medvinsky, A. L. & Dzierzak, E. A. (2002), 'Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity', *Blood* **99**(4), 1183–1189.
- Oostendorp, R. A. J., Medvinsky, A. J., Kusadasi, N., Nakayama, N., Harvey, K., Orello, C., Ottersbach, K., Covey, T., Ploemacher, R. E., Saris, C. & Dzierzak, E.

- (2002), 'Embryonal subregion-derived stromal cell lines from novel temperature-sensitive sv40 t antigen transgenic mice support hematopoiesis', *Journal of cell science* **115**(Pt 10), 2099–2108.
- Ortlepp, C., Steudel, C., Heiderich, C., Koch, S., Jacobi, A., Ryser, M., Brenner, S., Bornhäuser, M., Brors, B., Hofmann, W.-K., Ehninger, G. & Thiede, C. (2013), 'Autotaxin is expressed in flt3-itd positive acute myeloid leukemia and hematopoietic stem cells and promotes cell migration and proliferation', *Experimental hematology* **41**(5), 444–461.e4.
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V. I., Paschka, P., Roberts, N. D., Potter, N. E., Heuser, M., Thol, F., Bolli, N., Gundem, G., van Loo, P., Martincorena, I., Ganly, P., Mudie, L., McLaren, S., O'Meara, S., Raine, K., Jones, D. R., Teague, J. W., Butler, A. P., Greaves, M. F., Ganser, A., Döhner, K., Schlenk, R. F., Döhner, H. & Campbell, P. J. (2016), 'Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia', *The New England journal of medicine* **374**(23), 2209–2221.
- Parmar, A., Marz, S., Rushton, S., Holzwarth, C., Lind, K., Kayser, S., Döhner, K., Peschel, C., Oostendorp, R. A. J. & Götze, K. S. (2011), 'Stromal niche cells protect early leukemic flt3-itd+ progenitor cells against first-generation flt3 tyrosine kinase inhibitors', *Cancer research* **71**(13), 4696–4706.
- Pemmaraju, N., Kantarjian, H., Andreeff, M., Cortes, J. & Ravandi, F. (2014), 'Investigational fms-like tyrosine kinase 3 inhibitors in treatment of acute myeloid leukemia', *Expert opinion on investigational drugs* **23**(7), 943–954.
- Ravandi, F., Alattar, M. L., Grunwald, M. R., Rudek, M. A., Rajkhowa, T., Richie, M. A., Pierce, S., Daver, N., Garcia-Manero, G., Faderl, S., Nazha, A., Konopleva, M., Borthakur, G., Burger, J., Kadia, T., Dellasala, S., Andreeff, M., Cortes, J., Kantarjian, H. & Levis, M. (2013), 'Phase 2 study of azacytidine plus sorafenib in patients with acute myeloid leukemia and flt-3 internal tandem duplication mutation', *Blood* **121**(23), 4655–4662.
- Reilly, J. T. (2005), 'Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis?', *British Journal of Haematology* **128**(1), 18–34.
- Rosnet, O., Bühring, H. J., Marchetto, S., Rappold, I., Lavagna, C., Sainty, D., Arnoulet, C., Chabannon, C., Kanz, L., Hannum, C. & Birnbaum, D. (1996), 'Human flt3/flk2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells', *Leukemia* **10**(2), 238–248.
- Rosnet, O., Marchetto, S., deLapeyriere, O. & Birnbaum, D. (1991), 'Murine flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the pdgfr/csf1r family', *Oncogene* **6**(9), 1641–1650.

- Schaich, M., Röllig, C., Soucek, S., Kramer, M., Thiede, C., Mohr, B., Oelschlaegel, U., Schmitz, N., Stuhlmann, R., Wandt, H., Schäfer-Eckart, K., Aulitzky, W., Kaufmann, M., Bodenstein, H., Tischler, J., Ho, A., Krämer, A., Bornhäuser, M., Schetelig, J. & Ehninger, G. (2011), 'Cytarabine dose of 36 g/m<sup>2</sup> compared with 12 g/m<sup>2</sup> within first consolidation in acute myeloid leukemia: results of patients enrolled onto the prospective randomized aml96 study', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**(19), 2696–2702.
- Silverman, L. R., Demakos, E. P., Peterson, B. L., Kornblith, A. B., Holland, J. C., Odchimar-Reissig, R., Stone, R. M., Nelson, D., Powell, B. L., DeCastro, C. M., Ellerton, J., Larson, R. A., Schiffer, C. A. & Holland, J. F. (2002), 'Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group b', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **20**(10), 2429–2440.
- Smith, C. C., Lasater, E. A., Lin, K. C., Wang, Q., McCreery, M. Q., Stewart, W. K., Damon, L. E., Perl, A. E., Jeschke, G. R., Sugita, M., Carroll, M., Kogan, S. C., Kuriyan, J. & Shah, N. P. (2014), 'Crenolanib is a selective type i pan-flt3 inhibitor', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**(14), 5319–5324.
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S. & Weissman, I. L. (1988), 'Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells', *Science (New York, N.Y.)* **241**(4861), 58–62.
- Spangrude, G. J., Smith, L., Uchida, N., Ikuta, K., Heimfeld, S., Friedman, J. & Weissman, I. L. (1991), 'Mouse hematopoietic stem cells', *Blood* **78**(6), 1395–1402.
- Spiekermann, K., Bagrintseva, K., Schwab, R., Schmieja, K. & Hiddemann, W. (2003), 'Overexpression and constitutive activation of flt3 induces stat5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells', *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**(6), 2140–2150.
- Steinberg, A., Asher, A., Bailey, C. & Fu, J. B. (2015), 'The role of physical rehabilitation in stem cell transplantation patients', *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* **23**(8), 2447–2460.
- Stresemann, C., Bokelmann, I., Mahlknecht, U. & Lyko, F. (2008), 'Azacytidine causes complex dna methylation responses in myeloid leukemia', *Molecular cancer therapeutics* **7**(9), 2998–3005.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. (2006), 'Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by cxcl12-cxcr4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches', *Immunity* **25**(6), 977–988.

- Vellenga, E., van Putten, W., Ossenkoppele, G. J., Verdonck, L. F., Theobald, M., Cornelissen, J. J., Huijgens, P. C., Maertens, J., Gratwohl, A., Schaafsma, R., Schanz, U., Graux, C., Schouten, H. C., Ferrant, A., Bargetzi, M., Fey, M. F. & Löwenberg, B. (2011), 'Autologous peripheral blood stem cell transplantation for acute myeloid leukemia', *Blood* **118**(23), 6037–6042.
- Warmuth, M., Kim, S., Gu, X.-j., Xia, G. & Adrián, F. (2007), 'Ba/f3 cells and their use in kinase drug discovery', *Current opinion in oncology* **19**(1), 55–60.
- Weinberg, O. K., Sohani, A. R., Bhargava, P. & Nardi, V. (2017), 'Diagnostic work-up of acute myeloid leukemia', *American journal of hematology* **92**(3), 317–321.
- Weiss C., J. W. (1997), *Physiologie des Menschen*, Springer Berlin Heidelberg.
- Wilson, A. & Trumpp, A. (2006), 'Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches', *Nature reviews. Immunology* **6**(2), 93–106.
- Yun, S., Vincelette, N. D., Abraham, I., Robertson, K. D., Fernandez-Zapico, M. E. & Patnaik, M. M. (2016), 'Targeting epigenetic pathways in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: a systematic review of hypomethylating agents trials', *Clinical epigenetics* **8**, 68.
- Zhang, H., Savage, S., Schultz, A. R., Bottomly, D., White, L., Segerdell, E., Wilmot, B., McWeeney, S. K., Eide, C. A., Nechiporuk, T., Carlos, A., Henson, R., Lin, C., Searles, R., Ho, H., Lam, Y. L., Sweat, R., Follit, C., Jain, V., Lind, E., Borthakur, G., Garcia-Manero, G., Ravandi, F., Kantarjian, H. M., Cortes, J., Collins, R., Buelow, D. R., Baker, S. D., Druker, B. J. & Tyner, J. W. (2019), 'Clinical resistance to crenolanib in acute myeloid leukemia due to diverse molecular mechanisms', *Nature communications* **10**(1), 244.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., Harris, S., Wiedemann, L. M., Mishina, Y. & Li, L. (2003), 'Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size', *Nature* **425**(6960), 836–841.