



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

**„Die Bedeutung regulierter Zelltodmechanismen für die Entstehung
und Therapie der Myelodysplastischen Syndrome und ihren Übergang
in sekundäre Akute Myeloische Leukämien“**

Richard T. Hauch

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

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Bernhard Haslinger

Prüfer*innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Philipp J. Jost

2. Priv.-Doz. Dr. Irene Teichert-von Lüttichau

Die Dissertation wurde am 01.09.2021 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.02.2022 angenommen.

Die vorliegende Dissertation wurde gefördert durch das Promotionsstipendium der deutschen José Carreras Leukämie-Stiftung und der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO)



In Gedenken an
Dr. Michael W. Hauch

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1 Verzeichnis der Abkürzungen	7
2 Einleitung	12
2.1 Regulierte Zelltodmechanismen	12
2.1.1 Apoptose	12
2.1.2 Nekroptose	13
2.2 RIPK1- und RIPK3-Kinaseaktivität	15
2.3 Myelodysplastische Syndrome	16
2.3.1 Definition und Epidemiologie	16
2.3.2 Pathogenese der Myelodysplastischen Syndrome	17
2.3.3 Inflammation und MDS	19
2.3.4 Klinische Symptomatik und Diagnostik	20
2.3.5 Therapie und Prognose	25
2.3.5.1 Niedrig- bis Intermediärisiko	25
2.3.5.2 Hochrisiko-Patienten	26
2.3.5.3 Standardtherapie mit 5-Azacytidin	26
2.3.5.4 Selektive BCL-2-Inhibition durch Venetoclax	29
3 Problemstellung	32
4 Material und Methodik	34
4.1 Material	34
4.1.1 Standardgeräte	34
4.1.2 Standardlösungen	34
4.1.3 Verbrauchsmaterialien	35
4.1.4 Chemikalien und biogene Substanzen	35
4.1.5 Pufferlösungen	36
4.1.6 Zellkulturmedien	36
4.1.7 Therapeutika und Inhibitoren	36
4.1.8 Fertig-Kits	36
4.1.9 Antikörper	37
4.1.10 Software	37

4.2	Methoden	37
4.2.1	Patientenproben	37
4.2.2	Gesunde Kontrollen	38
4.2.3	Aufreinigung der mononukleärer Knochenmarkzellen	38
4.2.4	Immunhistochemische Färbung der Proteinexpression von RIPK3	39
4.2.5	Messung der RIPK3-Proteinexpression im Durchflusszytometer	40
4.2.6	Inkubation und Therapeutika-Behandlung	40
4.2.7	Zelltodanalyse im Durchflusszytometer	40
4.2.8	Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit in der Methylcellulose	41
4.2.9	Statistische Auswertung	41
4.3	Klinische Patientenannotation	42
4.3.1	Klinische Annotation der untersuchten Patienten in Experimenten zu RIPK1 und RIPK3	42
4.3.2	Klinische Annotation der untersuchten Patienten in Experimenten zu Venetoclax und 5-Azacytidin	42
5	Ergebnisse	43
5.1	Receptor-interacting serine/threonine-protein Kinase 3 als potentieller Biomarker des MDS-Progresses	43
5.1.1	Receptor-interacting serine/threonine-protein Kinase 3 zeigt signifikante Expressionsunterschiede im Progress der Myelodysplastischen Syndrome und ihrem Übergang in die sekundäre Akute Myeloische Leukämie	43
5.1.2	Stadienabhängige RIPK3-Proteinexpression ist auch in der Chronischen Myelomonozytären Leukämie (CMML) nachweisbar	48
5.2	Modulation der Koloniebildungsfähigkeit durch Inhibition von RIPK1 und RIPK3	49
5.2.1	RIPK1- und RIPK3-Inhibition zeigen keinen Effekt auf die 72h-Viabilität von MDS-/sAML-Zellen oder gesunden Kontrollproben	49
5.2.2	RIPK1- und RIPK3-Inhibition zeigen keine langfristigen zytotoxischen Effekte auf die Koloniebildungsfähigkeit gesunder BMMNCs	51
5.2.3	Die Auswirkung der RIPK3-Inhibition durch GSK'843A auf das Knochenmark von Patienten mit MDS/sAML ist abhängig vom Krankheitsstadium	54
5.2.4	RIPK1-Inhibition durch Nec-1s erhöht die Koloniebildungsfähigkeit von MDS-/sAML-Stamm-/Vorläuferzellen	57

Inhaltsverzeichnis

5.3	Venetoclax in Kombination mit 5-Azacytidin als neue, effektive Therapieoption mit enger therapeutischer Breite in MDS/sAML	60
5.3.1	Einzel- und Kombinationsbehandlung mit niedrig dosiertem 5-Azacytidin und Venetoclax zeigen keine kurzzeitige Toxizität im gesunden Knochenmark	61
5.3.2	Niedrigdosierte Einzel- und Kombinationsbehandlung aus Venetoclax und 5-Azacytidin induzieren keine signifikante Veränderung der Koloniebildungsfähigkeit gesunder Knochenmarkzellen.....	63
5.3.3	Niedrigdosis-Kombination aus Venetoclax und 5-Azacytidin induziert effektiv Zelltod in MDS/sAML.....	64
5.3.4	Niedrigdosis-Kombination aus Venetoclax und 5-Azacytidin zeigt hohe Effektivität in der Verminderung der Koloniebildungsfähigkeit von MDS-/sAML-Knochenmark.....	66
6	Diskussion	69
6.1	Nekroptoseproteine als therapeutische Zielstruktur in der Behandlung der MDS	70
6.2	Venetoclax in Kombination mit 5-Azacytidin als gut verträgliche Behandlung therapieresistenter MDS mit enger therapeutischer Breite	74
7	Zusammenfassung	80
8	Anhang	82
9	Literaturverzeichnis.....	84
10	Abbildungsverzeichnis	95
11	Tabellenverzeichnis.....	96
12	Danksagung.....	97

1 Verzeichnis der Abkürzungen

°C	Grad Celsius
5-AZA	5-Azacytidin
7AAD	7-Aminoactinomycin D
ABT-199	Venetoclax
AG	Arbeitsgruppe
AML	Akute Myeloische Leukämie
ANC	Absolute neutrophil count
ANOVA	Analysis of Variance
ASH	American Society of Hematology
ASXL1	Additional Sex Combs-like 1
ATP	Adenosintriphosphat
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1
BAX	BCL-2 associated X protein
BAK	BCL-2 homologous antagonist/killer
BID	BH3 interacting-death domain agonist
BH3	BCL-2 homology domain 3
BOK	BCL-2 related ovarian killer
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2
BCL-X _L	B-cell lymphoma-extra large
BFU-E	Burst forming unit-Erythrocyte
BMMNC	Mononukleäre Knochenmarkzelle (Bone marrow mononuclear cell)
Caspase	Cysteiny-l-aspartate specific protease
CD34	Cluster of Differentiation 34
CD45	Cluster of Differentiation 45
CFC	Colony forming cell
CFU-GEMM	Colony forming unit-Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage, Megakaryocyte
CFU-GM	Colony forming unit-Granulocyte, Macrophage

Verzeichnis der Abkürzungen

c-FLIP	Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein
cIAP1	Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1
cIAP2	Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2
CARD	Caspase recruitment domain
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
Cmax	Gemessene maximale Serumkonzentration
CMML	Chronische Myelomonozytäre Leukämie
CR	Komplette Remission (Complete Remission)
del	Deletion
dl	Deziliter
DAMP	Danger-associated molecular pattern
DD	Death domain
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHA	European Hematology Association
EVI-1	Ecotropic virus integration site 1 protein homolog
EZH2	Enhancer of Zeste Homologue 2
FAB	French American British
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated Cell Sorting)
FADD	Fas associated Death Domain
FcR	Fc-Rezeptor (fragment crystallizable receptor)
FDA	U.S. Food and Drug Administration
Ficoll	Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer
g	Fallbeschleunigung
g	Gramm
GSK'843A	GSK'2393843A
h	Stunden (hours)
Hb	Hämoglobin
HI	Hämatologische Verbesserung (Hematologic improvement)
HMA	Hypomethylating agent
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration

Verzeichnis der Abkürzungen

ID	Identität (Patiententabelle)
ID	Intermediate domain
IL-3	Interleukin-3
IL-6	Interleukin-6
IL-1 β	Interleukin-1 β
Inkl.	Inklusive
IPSS	International Prognostic Scoring System
IPSS-R	International Prognostic Scoring System-Revised
IWG	International Working Group
JAK2	Janus Kinase 2
K _i	Inhibitor-Konstante
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
L	Liter
LIC	Leukämie induzierende Zellen (Leukemia inducing cells)
m ²	Quadratmeter
M	Molar
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MCL-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1
MDS	Myelodysplastische Syndrome
MDS-EB1	MDS mit Blastenvermehrung 1
MDS-EB2	MDS mit Blastenvermehrung 2
MDS-MLD	MDS mit multilineage dysplasia
MDS-SLD	MDS mit single lineage dysplasia
MDS-RS-MLD	MDS mit multilineage dysplasia und Ringsideroblasten
MDS-RS-SLD	MDS mit single lineage dysplasia und Ringsideroblasten
MFI	Mean Fluorescence Intensity
mg	Milligramm
min.	mindestens
ml	Milliliter
MLKL	Mixed lineage kinase domain like pseudokinase
mM	Millimolar
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
n.s.	nicht signifikant

Verzeichnis der Abkürzungen

Nec-1s	Necrostatin-1 stable
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
OMI	HtrA serine peptidase 2
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PR	Partielle Remission (Partial remission)
Pt	Punkte
RA	Refraktäre Anämie
RAEB-1	Refraktäre Anämie mit Blastenexzess 1
RAEB-2	Refraktäre Anämie mit Blastenexzess 2
RARS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RCMD	Refraktäre Zytopenie mit multiliniären Dysplasien
RCMD-RS	Refraktäre Zytopenie mit multiliniären Dysplasien und Ringsideroblasten
RHIM	RIP homotypic interaction motif
RIPK1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
RIPK3	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3
RN	Refraktäre Neutropenie
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Refraktäre Thrombozytopenie
RUNX1	Runt-related Transcription Factor 1
sAML	sekundäre Akute Myeloische Leukämie
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts (standard error of the mean)
SF3B1	Splicing factor 3B subunit 1
SMAC	Second mitochondrial-derived activator of caspase
SRSF2	Splicing factor, arginine/serine-rich 2
tMDS	Therapy-related MDS
TET2	Tet Methylcytosine Dioxygenase 2
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TNF-R	Tumornekrosefaktor Rezeptor

Verzeichnis der Abkürzungen

TP53	Tumor Protein 53
TRADD	TNF receptor-associated death domain
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
U2AF1	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit
vgl.	vergleiche
vs.	versus
VEN	Venetoclax
WHO	World Health Organization
WPSS	WHO Prognostic Scoring System
X	Nicht getestet / nicht anwendbar (Patiententabellen)
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
z.B.	zum Beispiel
ZBP1	Z-DNA-binding protein 1
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

2 Einleitung

2.1 Regulierte Zelltodmechanismen

Ein Schlüsselmechanismus im Entartungsprozess maligner Zellen ist die erfolgreiche Vermeidung von Zelltod (Adams & Cory, 2007; Hanahan & Weinberg, 2011; Yabal et al., 2014). Es sind eine Vielzahl an regulierten und unregulierten Zelltodmechanismen bekannt (Wu *et al.*, 2014). Die Experimente und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit betreffen zwei Formen des regulierten Zelltod: Apoptose und Nekroptose. Im Folgenden werden diese erläutert.

2.1.1 Apoptose

Ein zentraler Zelltodmechanismus ist der so genannte programmierte Zelltod – die Apoptose. Es wird zwischen intrinsischer und extrinsischer Apoptoseaktivierung unterschieden. Beide Signalkaskaden enden in einer gemeinsamen Endstrecke und führen zu dem geordneten Untergang der Zelle: Der intrinsische (auch „mitochondriale“) Apoptose-Signalweg beginnt mit Stresssignalen innerhalb der Zelle (z.B. Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schädigung), die das Gleichgewicht der anti- und pro-apoptotischen B-cell lymphoma 2 (BCL-2) Proteine zugunsten letzterer verschieben (Green, 2019; Wu *et al.*, 2014). Die pro-apoptotische Effektorproteine BCL-2 associated X protein (BAX), BCL-2 homologous antagonist/killer (BAK) und BCL-2 related ovarian killer (BOK) werden in vitalen Zellen durch verschiedene Mechanismen in ihrer Aktivität eingeschränkt: Die anti-apoptotischen Proteine BCL-2, Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1 (MCL-1) und B-cell lymphoma-extra large (BCL-X_L) inhibieren die Aktivierung und Oligomerisierung von BAX und BAK, während BOK durch konstanten Abbau an effektiver Aktivierung gehindert wird (Galluzzi *et al.*, 2018; Green, 2019; Wu *et al.*, 2014). Zellstress führt zu einer erhöhten Expression von pro-apoptotischen BCL-2 Proteinen (Green, 2019). Anschließend erfolgt die Aktivierung von BAX und BAK durch BCL-2 homology domain 3 (BH3)-only Proteine (Green, 2019; Westphal, Kluck, & Dewson, 2014). Die aktivierten pro-apoptotischen Effektorproteine BAX, BAK und BOK permeabilisieren die äußere Mitochondrienmembran (Mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)) (Green, 2019; Wu *et al.*, 2014). Es erfolgt ein Ausstrom einer Vielzahl von Proteinen

des intermembranösen Raumes ins Zytosol, unter ihnen Holocytochrom c. Dieses bindet an den apoptotic protease activating factor 1 (APAF1), welcher dann durch Oligomerisierung das Apoptosom bildet (Green, 2019; Wu *et al.*, 2014). Das Apoptosom aktiviert über Dimerisierung die Cysteinyl-aspartat specific protease (Caspase) 9, die daraufhin die Effektorcaspasen Caspase-3 und Caspase-7 aktiviert (Green, 2019; Wu *et al.*, 2014). Diese aktivieren in der Folge eine Vielzahl von Proteinen und setzen so die Zersetzung des Zellinneren und die konsequente Verpackung in Vesikel in Gang (Green, 2019; Wu *et al.*, 2014).

Auch der extrinsische (so genannte „Todesrezeptor-“) Signalweg führt zur Aktivierung der Effektorcaspasen Caspase-3 und Caspase-7, beginnend mit der Aktivierung eines Todesrezeptors aus der Familie der Tumornekrosefaktor- (TNF-) Rezeptoren (TNF-R) (Green, 2019; Wu *et al.*, 2014). Nach Aktivierung über verschiedene Liganden (z.B. TNF- α) und Trimerisierung des Rezeptors, werden Adapterproteine wie die Fas associated Death Domain (FADD) zum Rezeptor rekrutiert (Green, 2019; Wu *et al.*, 2014). Diese wiederum rekrutiert Caspase-8, welche weitere Caspase-8-Moleküle per Dimerisierung aktiviert (Green, 2019; Wu *et al.*, 2014). Die aktivierten Caspase-8-Dimere spalten und aktivieren in Folge die Effektorcaspasen Caspase-3 und Caspase-7 (Green, 2019; Wu *et al.*, 2014). Zudem können die Caspase-8-Dimere das proapoptische BCL-2 Protein BH3 interacting-domain death agonist (BID) aktivieren (Green, 2019; Wu *et al.*, 2014). BID antagonisiert die anti-apoptischen BCL-2 Proteine und aktiviert BAX. Durch BAX und BAK vermittelte MOMP kommt es zu einer zusätzlichen Signalkaskade durch Cytochrom c Ausstrom, sowie dem Ausstrom von Second mitochondrial-derived activator of caspase (SMAC) und HtrA serine peptidase 2 (OMI) (Green, 2019; Wu *et al.*, 2014). Diese Proteine inhibieren bzw. zersetzen daraufhin die Caspaseninhibitoren Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 und 2 (cIAP1 & cIAP2) und X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) (Green, 2019; Wu *et al.*, 2014). Infolgedessen wird die zelluläre anti-apoptische Barriere weiter geschwächt und die Caspasenkaskade verstärkt aktiviert (Green, 2019; Wu *et al.*, 2014).

2.1.2 Nekroptose

Neben den klassischen Formen der regulierten („Apoptose“) und unregulierten Zelltodmechanismen („Nekrose“) wurden in den letzten Jahren weitere Unterformen des Zelltods identifiziert. Hierunter fällt auch die „regulierte Nekrose“ („Nekroptose“)

(Green, 2019; Tang *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2014). Während die Apoptose mit Zellschrumpfung, Vesikelbildung und vor allem ohne Entzündungsreaktion verläuft, kommt es während der Nekroptose – ähnlich wie während der Nekrose – zur Freisetzung proinflammatorischer Moleküle aus dem Zellinneren (Pasparakis & Vandenabeele, 2015). Trotz gravierender Unterschiede zwischen den Mechanismen besteht eine enge Vernetzung der Signalkaskaden der Apoptose und Nekroptose: An mehreren Schlüsselstellen der Nekroptose kann die Zelle statt in einen proinflammatorischen Untergang in die regulierte und nicht-inflammatorische Apoptose übergehen bzw. dem Zelltod entgegenwirken und eine inflammatorische Signalkaskade in Gang setzen (Linkermann & Green, 2014). Entscheidend hierfür ist das Bestehen der Funktion bzw. die Expression von FADD und Caspase 8 (Linkermann & Green, 2014).

Die Aktivierung der Nekroptose-Signalkaskade kann dabei aufgrund diverser Stimuli erfolgen: Bindung von Liganden an Todesrezeptoren wie zum Beispiel Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (TNFR1) rekrutiert TNF receptor-associated death domain (TRADD) an den intrazellulären Teil des TNFR1 (Green, 2019; Pasparakis & Vandenabeele, 2015; Wu *et al.*, 2014). TRADD rekrutiert nun wiederum Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1) (Green, 2019; Pasparakis & Vandenabeele, 2015; Wu *et al.*, 2014). cIAP1 und cIAP 2 ubiquitinylieren RIPK1, woraufhin dieses den nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) aktiviert (Green, 2019; Pasparakis & Vandenabeele, 2015; Wu *et al.*, 2014). NF- κ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor unter anderem in Signalkaskaden der Zellproliferation und Immunantwort; es spielt eine zentrale Rolle in Proliferationsprozessen von Zellen, unter anderem Leukozyten, aber auch Krebszellen, in denen es häufig mutiert und konstitutiv aktiviert ist (Chaturvedi *et al.*, 2011; Xia, Shen, & Verma, 2014). So moduliert es Zellreaktionen auf Zellstress bzw. Zelltodinduktoren (Jin *et al.*, 2019; Pasparakis & Vandenabeele, 2015; Vlahopoulos, 2017). NF- κ B kann die Überleitung in die Apoptose-Signalkaskade verhindern, indem es die Proteinexpression von Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein (c-FLIP) induziert (Green, 2019; Pasparakis & Vandenabeele, 2015; Wu *et al.*, 2014). c-FLIP bindet und inhibiert dann Caspase 8 (Green, 2019; Pasparakis & Vandenabeele, 2015; Wu *et al.*, 2014). Nachdem Deubiquitinasen RIPK1 von seinen Ubiquitin-Ketten freigesetzt haben, kann sich dieses autophosphorylieren und autooligomerisieren (Green, 2019; Pasparakis & Vandenabeele, 2015; Wu *et al.*, 2014). Dieser Oligomer rekrutiert Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (RIPK3), welche wiederum

Mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL) phosphoryliert und aktiviert (Green, 2019; Pasparakis & Vandenabeele, 2015; Wu *et al.*, 2014). Diese Schritte können durch den FADD-caspase-8-c-FLIP-Komplex inhibiert werden, indem dieser die Phosphorylierung von RIPK1 und RIPK3 aufhebt und in den Apoptosesignalweg überleitet (Green, 2019; Pasparakis & Vandenabeele, 2015; Wu *et al.*, 2014). Phosphoryliertes MLKL oligomerisiert und bildet eine Membranpore, durch welche Zytokine und danger-associated molecular patterns (DAMPs) aus der Zelle ausströmen und Inflammations- und Zelltodsignale an umliegende Zellen leiten (Green, 2019; Pasparakis & Vandenabeele, 2015; Wu *et al.*, 2014). TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) ist ein weiterer Nekroptoseaktivator (Green, 2019). Nachdem entsprechende Liganden an Toll-like receptor 3 und 4 (TLR3 und TLR4) gebunden haben, aktiviert und oligomerisiert TRIF RIPK3, infolgedessen MLKL aktiviert wird. Auch virale DNA im Zytoplasma kann über Bindung an Z-DNA-binding protein 1 (ZBP1) und konsequente Aktivierung von RIPK3 zu Nekroptose führen (Pasparakis & Vandenabeele, 2015).

2.2 RIPK1- und RIPK3-Kinaseaktivität

Proteinkinasen phosphorylieren Aminosäuren durch Transfer einer Phosphatgruppe von einem Donor (zumeist Adenosintriphosphat (ATP)) auf die Hydroxylgruppe der Aminosäure (Fabbro, Cowan-Jacob, & Moebitz, 2015). Als Teil der posttranslationalen Modifikationsmechanismen erhöhen Proteinkinasen die Proteomdiversität und beeinflussen zahllose physiologische und pathologische Prozesse des Körpers, darunter Stoffwechselerkrankungen, (chronisch) entzündliche Erkrankungen und Krebserkrankungen (Fabbro, Cowan-Jacob, & Moebitz, 2015; Liu *et al.*, 2013; Walsh, Garneau-Tsodikova, & Gatto, 2005). RIPK1 und RIPK3 gehören zur Familie der Receptor interacting protein kinases, die sieben Serin/Threonin-Kinasen umfasst (Festjens *et al.*, 2007). Während RIPK1 am C-Terminus eine Todesdomäne (*death domain* (DD)), sowie eine caspase recruitment domain (CARD) enthält, die die Interaktion mit großen Proteinkomplexen ermöglichen, weist RIPK3 am C-Terminus ein RIP homotypic interaction motif (RHIM) auf, das keine Strukturverwandtschaft zu anderen bekannten Proteindomänen besitzt (Festjens *et al.*, 2007). RIPK3 interagiert durch RHIM mit RIPK1, das in seiner intermediate domain (ID) ebenfalls über ein RHIM verfügt (Festjens *et al.*, 2007; Green, 2019). Dies bildet die Grundlage zur Aktivierung von RIPK3, welches dann wiederum MLKL aktiviert und zum Ausstrom

pro-inflammatorischer Signale sowie zum Zelltod führen kann (Green, 2019). Sowohl RIPK1 als auch RIPK3 funktionieren über ihre Kinaseaktivität hinaus als Gerüstproteine (Kelliher *et al.*, 1998; Moriwaki & Chan, 2013; Newton *et al.*, 2014).

RIPK1 und RIPK3 sind zentrale Proteine an den Schnittstellen zwischen Inflammation und Nekroptose (Jost & Hockendorf, 2019). Eine Hemmung von RIPK1 bzw. RIPK3 in Mausmodellen von Myelodysplastischen Syndromen (MDS) und akuter myeloischer Leukämie (AML) zeigte divergente Effekte auf die Knochenmarkfunktion und maligne Myeloproliferation (Höckendorf *et al.*, 2016; Wagner *et al.*, 2019). Ein potenter und etablierter Inhibitor der Kinasefunktion von RIPK1 ist Necrostatin-1 stable (Nec-1s). Nec-1s ist eine via molekularer Modellierung hergestellte Weiterentwicklung des weniger spezifischen RIPK1-Inhibitors Necrostatin-1 (Takahashi *et al.*, 2012). Nec-1s weist bei einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 210 nM eine 1000-fach höhere Selektivität für RIPK1 als für alle anderen getesteten Kinasen auf (Takahashi *et al.*, 2012). GSK'2393843A (GSK'843A) ist ein RIPK3-Inhibitor mit minimaler Kreuzreaktion gegenüber anderen Kinasen (Mandal *et al.*, 2014). Er bindet RIPK3 mit einer IC_{50} von 8,6 nM und inhibiert die Kinase mit einer IC_{50} von 6,5 nM (Mandal *et al.*, 2014). Es ist zu beachten, dass sowohl Nec-1s als auch GSK'843A einzig die Kinaseaktivität ihrer Substrate RIPK1 bzw. RIPK3 inhibieren, nicht aber ihre Funktion als Gerüstprotein.

2.3 Myelodysplastische Syndrome

2.3.1 Definition und Epidemiologie

Myelodysplastische Syndrome sind eine Gruppe von Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzelle und ihrer Mikroumgebung. Sie sind charakterisiert durch Dysplasie in einer oder mehreren Zellreihen, hämatopoetischer Insuffizienz mit Ein- bis Mehrlinienzytopenien und dem Risiko einer Transformation in eine sekundäre Akute Myeloische Leukämie (sAML) (Hofmann W. *et al.*, 2018). Initialbefund im Rahmen der Diagnostik ist zumeist eine Anämie oder auch Bi- bzw. Panzytopenie im peripheren Blut (Hofmann W. *et al.*, 2018). Ein Großteil der Patienten weist trotz der peripheren Zytopenien ein hyperzelluläres Knochenmark auf. Ausnahme ist eine Subgruppe von ca. 10% der Patienten mit hypozellulärem Knochenmark (Corey *et al.*, 2007; Hofmann W. *et al.*, 2018). In differentialdiagnostische Überlegungen werden unter anderem aplastische Anämie, toxischer Knochenmarkschaden, reaktive

Knochenmarkveränderung, paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie, akute Leukämien, myeloproliferative Erkrankungen, megaloblastäre Anämien und das Hyperspleniesyndrom eingeschlossen (Hofmann W. *et al.*, 2018; Montalban-Bravo & Garcia-Manero, 2018). Zudem besteht eine Verwandtschaft zur Chronisch Myelomonozytären Leukämie (CMML). Die CMML steht als Erkrankung zwischen den MDS und den Myeloproliferativen Neoplasien (MPN), da sie Charakteristika beider Gruppen aufweist: So finden sich im Blut der Patienten Dysplasien und Zytopenien oder erhöhte Werte diverser Blutzelllinien vergleichbar mit MDS-Erkrankungen (Germin *et al.*, 2018). Eine weitere Ähnlichkeit ist die Tatsache, dass ein signifikanter Teil der CMML-Erkrankungen (10%) auf vorangegangene (Krebs-) Therapien zurückgeht (Germin *et al.*, 2018). Ebenso transformieren nach aktuellen Erkenntnissen 15-30% aller CMML-Erkrankungen in eine sAML (Germin *et al.*, 2018). Andererseits ist das definierende Merkmal der CMML die extrem hohe Zahl von Monozyten in Knochenmark und Peripherie (Germin *et al.*, 2018). Zusammengefasst kann sich die Erkrankung wie Myelodysplastische Syndrome (MDS) mit begleitender Monozytose (Leukozyten $<13.000/\mu\text{l}$) oder wie Myeloproliferative Neoplasien (MPN) (Leukozyten $>13.000/\mu\text{l}$) präsentieren. Sie ist nunmehr Teil der MDS/MPN-Gruppe der überarbeiteten WHO Klassifizierung von 2016 (Arber *et al.*, 2016).

MDS gehört zu den häufigsten malignen Hämatopathologien älterer Menschen. Durchschnittlich erkranken ca. 4-5/100.000 Menschen jährlich an MDS, jedoch steigt die Inzidenz in der Gruppe der über 70-Jährigen auf 30-50/100.000 Erkrankungen jährlich (Hofmann W. *et al.*, 2018). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei ca. 75 Jahren (Aul, Giagounidis, & Germin, 2001; Hofmann W. *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2007; Neukirchen *et al.*, 2011). Männer sind 1.17- bis 1.66-mal häufiger betroffen als Frauen (Hofmann W. *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2007; Neukirchen *et al.*, 2011). Zu den häufigsten Todesursachen im Rahmen einer MDS-Erkrankung zählen Infektionen aufgrund der progressiven Zytopenien und die Transformation zur sAML (Dayyani *et al.*, 2010).

2.3.2 Pathogenese der Myelodysplastischen Syndrome

Bis heute ist die exakte Pathogenese bzw. die Gewichtung einzelner ursächlicher Faktoren für die Entstehung und den Progress der Myelodysplastischen Syndrome nicht abschließend geklärt. Klar ist, dass MDS eine klonale Erkrankung der hämatopoetischen Stammzelle ist. Dem Einfluss der Mikroumgebung wird zunehmend

ein immer größerer Stellenwert zugewiesen. Neben einem Hauptklon können weitere Subklone im MDS-Knochenmark vorliegen (M. J. Walter *et al.*, 2013). Der im Progress zu sAML Dominanz-erlangende Klon findet sich dabei häufig bereits als Subklon im frühen MDS-Stadium (M.J. Walter *et al.*, 2012).

Hämatologische Grunderkrankungen wie z.B. die Fanconi-Anämie oder diverse Noxen wie alkylierende Substanzen, Chemotherapeutika oder Bestrahlung erhöhen das Risiko an MDS zu erkranken. Von einem einheitlichen Entstehungsprozess dieser heterogenen Erkrankungsgruppe kann jedoch nicht gesprochen werden (Corey *et al.*, 2007). Die erhöhte Inzidenz von MDS in älteren Patienten legt nahe, dass in einem Teil der Patienten die ursächlichen genetischen Veränderungen durch kumulative Exposition gegenüber schädlichen Noxen entstehen (Corey *et al.*, 2007). Bekannt ist in diesem Zusammenhang unter anderen die erhöhte Rate an MDS-Erkrankungen unter ehemaligen Chemotherapie- und Bestrahlungspatienten, die als „Therapy-related MDS“ (tMDS) bezeichnet werden (Corey *et al.*, 2007).

Je nach herangezogener Studien weisen circa 43-51% aller MDS-Patienten typische prognostisch negative Karyotypveränderungen an den Chromosomen 5, 7, 8, 17 und 20 auf (Raza & Galili, 2012). Zudem lassen sich in 78% der Patienten eine oder mehrere onkogene Genmutationen finden (Papaemmanuil *et al.*, 2013); einige davon in bis zu 20% aller Fälle. Die entsprechenden Genabschnitte kodieren für das Tumorsuppressorgen Tumor Protein 53 (*TP53*), die Onkogene Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (*NRAS*) und Kirsten rat sarcoma viral oncogene (*KRAS*) oder Proteine deren Funktion entscheidend für die Transkription und die Histon-Bindung der DNA sind (bspw. Splicing factor, arginine/serine-rich 2 (*SRSF2*), Splicing factor U2AF 35 kDa subunit (*U2AF1*), Enhancer of Zeste Homologue 2 (*EZH2*), Additional Sex Combs-like 1 (*ASLX1*) (Raza & Galili, 2012). Die Fülle unterschiedlicher Karyotypveränderungen und Genmutationen spiegeln die heterogenen klinischen Bilder und Verläufe der Myelodysplastischen Syndrome wider. Es wird angenommen, dass einige Mutationen verhältnismäßig früh als so genannte „driver mutation“ in der transformierenden Stammzelle auftreten (Papaemmanuil *et al.*, 2013). Diese Mutationen – häufig das Spliceosom und die DNA-Methylierung betreffend – geben der entarteten Stammzelle einen Überlebens- und Proliferationsvorteil und begünstigen eine klonale Expansion (Papaemmanuil *et al.*, 2013). Interessanterweise scheint es hierbei keinen Unterschied hinsichtlich der individuellen Prognose zu geben, ob diese Mutationen im

Hauptklon oder in den Subklonen auftreten (Papaemmanuil *et al.*, 2013). Im Progress der Entartung und Expansion werden weitere Mutationen akquiriert. Im Unterschied zur *de novo* AML verlieren MDS-Zellen dabei allerdings nicht die Fähigkeit zur Differenzierung in hierarchisch niedrigere Zelltypen (Corey *et al.*, 2007). Diese können ebenso wie ihre Progenitorzellen Dysplasiezeichen aufweisen (Corey *et al.*, 2007). Das in den meisten MDS-Patienten hyperproliferative Knochenmark wird dabei durch eine ebenso hochregulierte Zelltodrate vor allem in den frühen Stadien begleitet. Hiermit lassen sich periphere Zytopenien einer oder mehrerer Zelllinien bei gleichzeitig hoher Proliferation im Knochenmark erklären (Corey *et al.*, 2007; Raza & Galili, 2012). Im Progress zur sAML verändert sich diese Situation: Die Differenzierung der Progenitorzellen in niedrigere Zellhierarchien geht ebenso wie die Fähigkeit zur erfolgreichen Zelltodinduktion verloren, während die erhöhte Proliferationsrate bestehen bleibt (Corey *et al.*, 2007; Hellström-Lindberg *et al.*, 2001; Maher Albitar *et al.*, 2002). Dabei ist der Verlust funktionaler, gesunder (Rest-) Hämatopoese in MDS vermutlich eher auf parakrin ausgeschüttete, inflammatorische Signale zurückzuführen als auf Verdrängung der gesunden Zellen durch Nischenkonkurrenz der entarteten Klone (Corey *et al.*, 2007).

2.3.3 Inflammation und MDS

MDS-erkranktes Knochenmark weist insbesondere in den frühen Krankheitsstadien eine Hyperproliferation des Knochenmarks bei gleichzeitig erhöhter Zelltodrate auf (Corey *et al.*, 2007; Raza & Galili, 2012). Bereits früh beschrieben Studien Fälle von korrelativ auftretenden mit erhöhter Inflammation einhergehenden Autoimmunerkrankungen und MDS (Ganan-Gomez *et al.*, 2015). Erhöhte pro-inflammatorische Zytokinlevel im Blut MDS-Erkrankter sind vielfach beschrieben (Ganan-Gomez *et al.*, 2015). Zudem zeigen einige pro-inflammatorische Zytokine in MDS-Erkrankten positive Korrelationen zwischen Expressionslevel und einer ungünstigen Prognose, insbesondere TNF- α (Tsimberidou *et al.*, 2008). Im Mausmodell wurde der weitreichende Einfluss RIPK3-abhängiger Nekroptose auf die Pathologie hämatopoetischer Erkrankungen bereits beschrieben (Duprez *et al.*, 2011; Rickard *et al.*, 2014; Yabal *et al.*, 2014). Wagner *et al.* zeigten 2018 im Mausmodell, dass erhöhte Nekroptoseraten bei veränderter Apoptosefähigkeit im Knochenmark von *BaxBakBid-Knockout*-Mäusen das Bild einer humanen MDS-Erkrankung widerspiegeln (Wagner *et al.*, 2019). Entsprechend behandelte Knochenmarkzellen zeigten erhöhte Expressionslevel von pro-

inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-1 β (IL-1 β) (Wagner *et al.*, 2019). Reduktion von erhöhten RIPK1-Expressionleveln in den Knochenmärkern der *Knockout*-Mäuse führte zu verminderten Zytopenieraten und verzögertem Knochenmarkversagen (Wagner *et al.*, 2019). Gleichzeitig zeigten Höckendorf *et al.* 2016, dass ein Verlust von RIPK3-Expression zu einer erhöhten malignen Myeloproliferation in der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) führt (Höckendorf *et al.*, 2016). Ebenso konnten erhöhte Genexpressionslevel von RIPK3 und MLKL in den Cluster of differentiation 34 positiven (CD34⁺) Zellen von MDS-Patienten nachgewiesen werden (Höckendorf *et al.*, 2016). Die enge Verknüpfung und Wechselwirkungen von pro-inflammatorischen Zytokinen, Effektorproteinen und regulierten wie unregulierten Zelltodmechanismen legen eine grundlegende Bedeutung von pro-inflammatorischen Signalen bzw. Entzündungsgeschehen im Knochenmark in Pathogenese und Progress von myeloischen Erkrankungen nahe (Craver *et al.*, 2018; Ganan-Gomez *et al.*, 2015; Höckendorf *et al.*, 2016; Yabal *et al.*, 2014).

2.3.4 Klinische Symptomatik und Diagnostik

In den meisten Fällen einer MDS-Erkrankung tritt eine periphere Anämie als Erstmanifestation auf (Hofmann W. *et al.*, 2018). Je nach Schweregrad können die Auswirkungen einer Anämie von leichter Leistungsschwäche bis hin zur transfusionspflichtigen Einschränkung der Lebensqualität reichen. Auch erhöhte Infektanfälligkeit im Zuge einer Neutropenie oder eine (klinisch meist zunächst noch nicht symptomatische) Thrombopenie können erste Hinweise auf die Erkrankung sein (Corey *et al.*, 2007; Hofmann W. *et al.*, 2018). Die Diagnose MDS wird anhand erkrankungstypischer Befunde aus peripheren Blut- und Knochenmarkzellen gestellt: charakteristische Abnormalien im Differentialblutbild und Knochenmarkausstrich, Dysplasiezeichen, typische Mutationen, oder Karyotypveränderungen können Hinweise auf Vorliegen eines MDS liefern. Definitiv müssen Dysplasiezeichen in mindestens 10% der Zellen einer Zellreihe zu finden sein (Tefferi & Vardiman, 2009). Zentrale Bedeutung kommt der zytomorphologischen Untersuchung des Blutes sowie des Knochenmarks zu, in denen eine möglichst exakte periphere und medulläre Blastenzahl bestimmt wird (Hofmann W. *et al.*, 2018). Die World Health Organization (WHO) etablierte und überarbeitet fortlaufend das neben der French-American-British (FAB)-Klassifikation am häufigsten genutzte Diagnosesystem für MDS (Arber *et al.*, 2016).

Einleitung

Name	Zytopenien	Blasten im Blut	Knochenmarkbefunde & Zytogenetik
MDS mit single lineage dysplasia (MDS-SLD) <i>RA, RN, RT</i> *	1-2	<1%	Blasten <5%, keine Auerstäbchen, <15% Ringsideroblasten
MDS mit multilineage dysplasia (MDS-MLD) <i>RCMD</i> *	1-3	<1%	Blasten <5%, keine Auerstäbchen, <15% Ringsideroblasten
MDS mit single lineage dysplasia und Ringsideroblasten (MDS-RS-SLD) <i>RARS</i> *	1-2	<1%	Blasten <5%, keine Auerstäbchen, >15% Ringsideroblasten oder >5% und SF3B1 Mutation
MDS mit multilineage dysplasia und Ringsideroblasten (MDS-RS-MLD) <i>RCMD-RS</i> *	1-3	<1%	Blasten <5%, keine Auerstäbchen, >15% Ringsideroblasten oder >5% und SF3B1 Mutation
MDS mit del(5q)	1-2	<1%	Blasten <5%, keine Auerstäbchen, del(5q) allein oder mit 1 Zusatzanomalie (nicht Chromosom 7)
MDS mit Blastenvermehrung (MDS-EB1) <i>RAEB 1</i> *	1-3	<5%	Blasten <10%, keine Auerstäbchen
MDS mit Blastenvermehrung (MDS-EB2) <i>RAEB 2</i> *	1-3	<20%	Blasten <20%, Auerstäbchen möglich
MDS unklassifiziert	a) MDS-SLD mit Panzytopenie b) MDS-SLD/ MDS-MLD/ MDS del(5q) mit 1% Blasten im Blut c) MDS ohne eindeutige Dysplasien, aber mit MDS definierender chromosomaler Aberration		Blasten <5%, keine Auerstäbchen
* nach WHO-Klassifikation von 2008			

Tabelle 1: Klassifikation Myelodysplastischer Syndrome nach WHO 2016 (Arber *et al.*, 2016; Tabelle modifiziert nach MDS-Register, 2018)

Dieses bewertet vor allem die Anzahl dysplastischer Zellreihen und die Anzahl der Blasten in Peripherie und Knochenmark (Tabelle 1). Zudem definiert es eine sAML als Vorliegen einer Blastenzahl von $\geq 20\%$ in Knochenmark oder Blut gegenüber anderen Klassifikationen, die erst ab einem Blastenanteil von $\geq 30\%$ von einer sAML sprechen. Die vorliegende Arbeit folgt der WHO-Klassifikation.

In etwa 60% aller MDS-Patienten treten Chromosomenaberrationen auf (Raza & Galili, 2012). Während die Aberrationen del(11q) und -Y mit einer Prognoseverbesserung gegenüber dem Standard 46, XX/XY Karyotyp assoziiert sind und die Aberrationen del(5q), del(12p) und del(20q) zumindest keine Prognoseverschlechterung bewirken, bedeuten eine Vielzahl dieser Karyotypveränderungen eine Verschlechterung der Prognose für die Patienten (Greenberg *et al.*, 2012; Schanz *et al.*, 2012). Dementsprechend fließen sie in die gängigen Risikoklassifikationssysteme zu MDS ein. Zu diesen zählen das International Prognostic Scoring System (IPSS) (P. Greenberg *et al.*, 1997), das International Prognostic Scoring System-revised (IPSS-r) (Greenberg *et al.*, 2012; Schanz *et al.*, 2012) und das WHO Prognostic Scoring System (WPSS) (Malcovati *et al.*, 2011). Die Deletion des q-Arms auf Chromosom 5 (del5-q-Syndrom) ist dabei über die Prognoseveränderung hinaus bedeutsam: del5q-Syndrome werden zu den Niedrigrisiko-MDS gezählt und weisen größtenteils übereinstimmende Symptomatik mit den übrigen Erkrankungen auf, sprechen aber im Gegensatz zu anderen Erkrankungen der MDS-Gruppe auf eine Therapie mit Lenalidomid an (Hofmann W. *et al.*, 2018). Zudem zeigen sich prognostische Konsequenzen für fortlaufendes Mutationsgeschehen auf Chromosomenebene auch nach der initialen Diagnose und Prognosestellung. Somit kann in Zukunft von einer Etablierung zeitpunktabhängiger zytogenetischer Diagnostik in der Prognoseklassifikationen ausgegangen werden (Schanz *et al.*, 2018).

Das IPSS bewertet vor allem den Anteil medullärer Blasten in Prozent sowie in geringerer Stärke Karyotypveränderungen und die Anzahl der peripheren Zytopenien (Tabelle 2). Im Gegensatz zur WHO-Klassifikation wird eine sAML erst ab einem medullären Blastenanteil von $\geq 30\%$ definiert (P. Greenberg *et al.*, 1997). Aus dem errechneten Punktwert ergeben sich die Risikogruppen: „*Low-risk*“, „*Intermediate-risk 1&2*“, oder „*high-risk*“ mit jeweils sinkender medianer Überlebenszeit von über fünf bis unter einem Jahr (P. Greenberg *et al.*, 1997).

Einleitung

Punktwert	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Medulläre Blasten (%)	<5	5-10	–	11-20	21-30
Anzahl an Zytopenien *	0-1	2-3	–	–	–
Zytogenetische Risikogruppe **	Niedrig	Intermediär	Hoch	–	–
Punktzahl	Risikogruppe		Medianes Überleben		
0	Low-risk		5.7 Jahre		
0.5-1	Intermediate-risk 1		3.5 Jahre		
1.5-2	Intermediate-risk 2		1.2 Jahre		
≥2.5	High-risk		0.4 Jahre		
* Thrombozyten < 100.000/μl, Hämoglobin < 10 g/dl, ANC < 1.800/μl					
** Niedrig = normaler Karyotyp, 5q-, 20q-, -Y; Hoch = komplexer Karyotyp (≥ 3 Anomalien), Chromosom 7-Anomalien; Intermediär = alle anderen Aberrationen					

Tabelle 2: IPSS-Kriterien, Berechnung und Risikogruppen-Klassifikation (Tabelle modifiziert nach MDS-Register, 2018; P. Greenberg *et al.*, 1997)

Nachdem weitere Studien die Korrelation zwischen diversen chromosomalen Aberrationen und dem medianen Überleben der Patienten feiner differenziert und somit neue Risikogruppen geschaffen hatten, wurden das IPSS überarbeitet zum IPSS-r (Schanz *et al.*, 2012). Auch die bisherige Kategorie der Anzahl der Zytopenien wurde genauer aufgeschlüsselt und erweitert (Tabelle 3) (P. Greenberg *et al.*, 1997).

Einleitung

Punktwert	0	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0
Zytogenetische Risikogruppe *	Sehr gut	–	gut	–	intermediär	schlecht	Sehr schlecht
Medulläre Blasten (%)	<2	–	2–5	–	5-10	>10	–
Hämoglobin	>10	–	8-10	<8	–	–	–
Thrombozyten	>100	50-100	<50	–	–	–	–
ANC	>0.8	<0.8	–	–	–	–	–
Punktzahl	Risikogruppe		Medianes Überleben		Mediane Zeit bis AML-Progress (25%)		
0-1.5	Very low risk		8.8 Jahre		Nicht erreicht		
1.5-3	Low risk		5.3 Jahre		10.8		
>3-4.5	Intermediate risk		3.0 Jahre		3.2		
4.5-6	High risk		1.6 Jahre		1.4		
>6	Very high risk		0.8 Jahre		0.73		
* Sehr gut = del(11q), -Y; Gut = normaler Karyotyp, del(20q), del(5q), del(12p), 2 Anomalien inkl. del(5q); Intermediär = +8, del(7q), i(17q), +19, alle andern Einzel- oder unabhängigen Doppelklone; Schlecht = -7, inv(3)/t(3q)/del(3q), 2 Anomalien inkl. -7/del(7q), komplex: 3 Anomalien; Sehr schlecht = Komplex >3 Anomalien							

Tabelle 3: IPSS-r-Kriterien, Berechnung und Risikogruppen-Klassifikation (Greenberg *et al.*, 2012; Tabelle modifiziert nach MDS-Register, 2018)

Das zudem gebräuchliche WPSS ähnelt in seiner Berechnung den Kriterien des IPSS, nutzt aber die WHO-Diagnoseklassifikation im Gegensatz zur medullären Blastenzahl als stärkstes Gewicht (Tabelle 4) (Malcovati *et al.*, 2011; Vardiman *et al.*, 2009).

Punktwert	0	1	2	3
Diagnose nach WHO	RA/RA RS/5q-	RCMD/RSCM D	RAEB 1	RAEB 2
Zytogenetische Risikogruppe *	Niedrig	Intermediär	Hoch	–
Transfusionsnotwendigkeit **	Keine	Regelmäßig	–	–
Punktzahl	Risikogruppe			
0	Very low risk			
1	Low risk			
2	Intermediate risk			
3-4	High risk			
5-6	Very high risk			
* Niedriges Risiko = normaler Karyotyp, del(5q), del(20q), -Y Hohes Risiko = komplexer Karyotyp (≥ 3 Anomalien), Chromosom 7-Anomalien Intermediäres Risiko = alle weiteren Aberrationen				
** Mindestens eine Transfusion alle acht Wochen innerhalb von drei Monaten				

Tabelle 4: WPSS-Kriterien, Berechnung und Risikogruppen-Klassifikation (Malcovati *et al.*, 2011; Tabelle modifiziert nach MDS-Register, 2018; Vardiman *et al.*, 2009)

2.3.5 Therapie und Prognose

2.3.5.1 Niedrig- bis Intermediärisiko

Niedrig- bis Intermediärrisiko-MDS-Patienten nach IPSS, IPSS-r und WPSS Klassifikation haben im Allgemeinen eine gute Prognose hinsichtlich ihrer Lebenserwartung und ein geringes Risiko einer sAML-Transformation (Greenberg *et al.*, 2012; Malcovati *et al.*, 2011). Liegen weder relevante Begleiterkrankungen noch schwere Zytopenien vor, können sie abwartend behandelt werden (Hofmann W. *et al.*, 2018). Die häufig vorliegende Anämie führt jedoch oft – insbesondere in älteren Patienten – zum Symptom der Fatigue, mit erhöhtem Risiko für Folgeschäden und -belastungen durch Stürze, verminderter Kognition und Lebensqualität (Hofmann W. *et al.*, 2018). Aufgrund dessen stellt sie häufig eine Indikation zum Therapiebeginn dar. Entsprechende Therapieoptionen werden in niederen Risikogruppen als supportive

Therapie zusammengefasst. Diese umfassen neben der Transfusion von Erythrozytenkonzentraten auch die Transfusion von Thrombozytenkonzentraten und eine bedarfsweise Antibiotikabehandlung bei Infektionen (Hofmann W. *et al.*, 2018). Daneben bestehen Therapieansätze mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, Immunmodulatoren wie z.B. Lenalidomid (für die Gruppe der del5q-MDS) und Immunsuppressiva. 30-60% der Patienten erreichen auf diese Weise klinische Verbesserung, Transfusionsfreiheit oder sogar zytogenetische Remission (Hofmann W. *et al.*, 2018; Luca Malcovati, 2013). Einzig kurative Therapieoption verbleibt bisher die allogene Stammzelltransplantation. Zwar findet diese aufgrund hoher transplantationsassoziiertes Risiken zumeist Anwendung bei Hochrisiko-Patienten, kann aber auch bei jüngeren Niedrigrisiko-Patienten mit Versagen nach Erstlinientherapie oder Vorliegen prognostisch ungünstiger Mutationen in Betracht gezogen werden (Hofmann W. *et al.*, 2018). Dabei zeigten sich für Niedrigrisiko-Patienten bei weiterhin großer transplantationsassoziiertes Mortalität ein höheres krankheitsfreies Überleben als im Kollektiv der Hochrisiko-Patienten nach Stammzelltransplantation (Sierra *et al.*, 2002).

2.3.5.2 Hochrisiko-Patienten

Sofern nach einer individuellen Nutzen-Risikoabwägung eine Stammzelltransplantation für den Patienten nicht in Frage kommt, besteht das Standardtherapieschema aus der Gabe des Pyrimidin-Analogen 5-Azacytidin (5-AZA) (Abbildung 1) (Hofmann W. *et al.*, 2018). Zudem findet 5-AZA Anwendung als Übergangstherapie bei Rezidiven oder vor einer allogenen Stammzelltransplantation (Hofmann W. *et al.*, 2018; Prebet *et al.*, 2011)

2.3.5.3 Standardtherapie mit 5-Azacytidin

5-Azacytidin ist strukturverwandt mit der DNA-Base Cytidin und unterscheidet sich von dieser lediglich durch ein Stickstoffatom an Position 5 anstelle einer Kohlenwasserstoffgruppe (Abbildung 1). Aus dem Pyrimidingrundgerüst wird ein 1,3,5-Triazingrundgerüst, das nach Aufnahme in die Zelle in DNA und RNA eingebaut werden kann (Čihák, 1974). Durch diesen Einbau bewirkt es direkte Zytotoxizität und kann zum Absterben der Zelle führen. Zudem blockiert 5-Azacytidin die DNA-Methyltransferase (Cihák & Veselý, 1978). Infolge kommt es zu Demethylierungen von DNA-Abschnitten mit weitreichenden Auswirkungen auf die DNA- und

Proteinsynthese der Zellen (Cihák & Veselý, 1978). Aufgrund dieser Eigenschaft werden 5-Azacytidin und sein Verwandter Decitabin zur Gruppe der Hypomethylierenden Agenzien gezählt (Hypomethylating agent: HMA). Diverse Krebsentitäten (unter anderen MDS) ermöglichen und fördern ihr vom normalen Zellzyklus entartetes Wachstum durch epigenetische Veränderungen an den Promotorregionen einzelner Tumorsuppressorgene (Herman & Baylin, 2003; Issa, 2010). Diese epigenetischen Modulationen werden durch Mitose auf neu entstehende Klone übertragen und stellen so einen entscheidenden Schritt in der klonalen Evolution der MDS-Erkrankung dar (Bird, 2002). HMA wirken diesem Überlebensvorteil maligner Zellen entgegen.

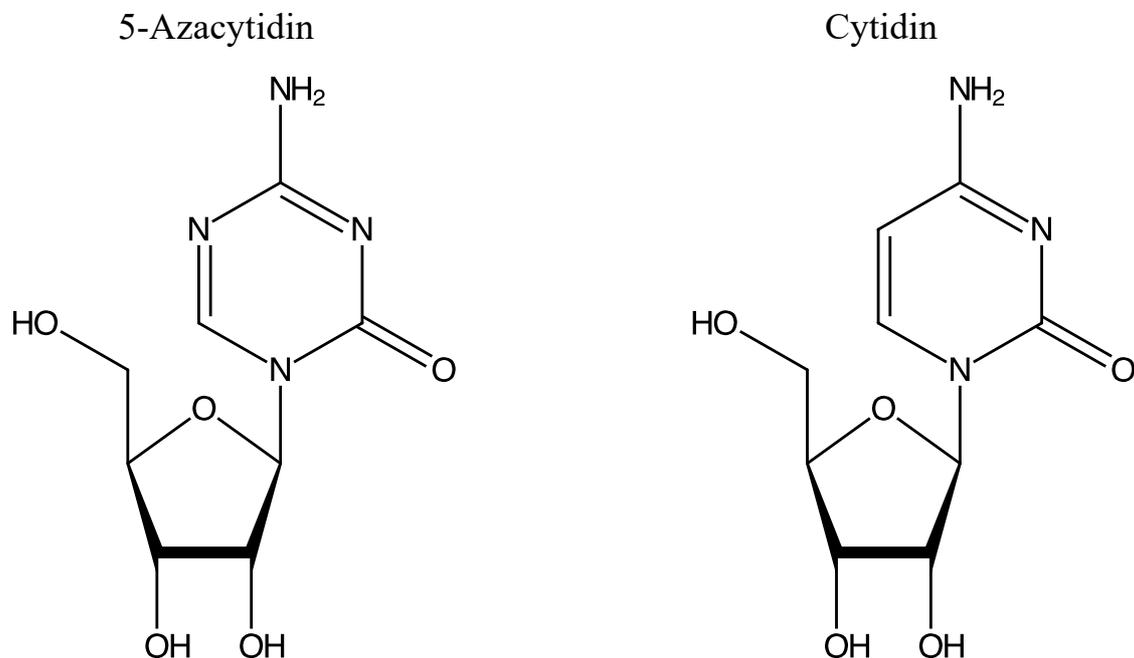


Abbildung 1: Pyrimidin-Analoga 5-Azacytidin und Cytidin (angelehnt an Čihák, 1974)

Das Standardtherapieschema zu 5-Azacytidin in MDS besteht im klinischen Alltag aus 75 mg/m²/d subkutan verabreichtem 5-Azacytidin für sieben Tage am Stück mit darauf folgend 21 Tagen Therapiepause (Hofmann W. *et al.*, 2018). Da die epigenetischen Veränderungen erst im Verlauf von mehreren Wochen wirksam werden, sollten mindestens vier bis sechs Zyklen vollzogen werden, bevor von einem (Nicht-)ansprechen ausgegangen werden kann (Hofmann W. *et al.*, 2018). Eine Behandlung mit 5-Azacytidin war einer rein supportiven Therapie in Studien mit Hochrisiko-MDS-Patienten in Bezug auf das mediane Überleben signifikant überlegen

(Pierre Fenaux *et al.*, 2009; Silverman *et al.*, 2002; Silverman *et al.*, 2005). So wurden bei 48% der behandelten Patienten ein generelles Ansprechen auf die Therapie beobachtet, bei 1% eine partielle Remission und bei 10% eine komplette Remission (Silverman *et al.*, 2005). Der mediane Überlebensvorteil gegenüber einer rein supportiven Therapie betrug dabei in den beiden erstgenannten Studien 6-9 Monate (Pierre Fenaux *et al.*, 2009; Silverman *et al.*, 2002).

Je nach herangezogener Studie zeigen zwischen 40-71% der Patienten kein Ansprechen auf eine Behandlung mit 5-Azacytidin (Cheson *et al.*, 2006; Müller-Thomas *et al.*, 2014; Silverman *et al.*, 2002). Das mediane Ansprechen unter 5-Azacytidin beträgt in Studien 14.1 Monate (Pierre Fenaux *et al.*, 2009). Für das Kollektiv der Patienten, die im Therapieverlauf einem Progress unterliegen oder von Beginn an kein Ansprechen auf 5-Azacytidin zeigen („*Failure*“), ist die Prognose sehr schlecht: das mediane Überleben nach 5-Azacytidin-*Failure* beträgt 5.6 Monate (Prebet *et al.*, 2011). Dabei wird das Ansprechen nach den 2000 etablierten und 2006 überarbeiteten Kriterien der International Working Group (IWG) bewertet (Tabelle 5) (Cheson *et al.*, 2006).

Kategorie	Kriterien für das Ansprechen gegen 5-Azacytidin (Dauer min. 4 Wochen)
Komplette Remission (CR)	<p>Knochenmark:</p> <p>≤5% Myeloblasten mit normaler Differenzierung in allen Zellreihen</p> <p>Peripheres Blut:</p> <p>Hb ≥11 g/dL_{SEP}</p> <p>Thrombozyten ≥100 x 10⁹/L</p> <p>Neutrophile ≥1.0 x 10⁹/L</p> <p>Blasten 0%</p>
Partielle Remission (PR)	<p>Alle CR Kriterien sofern abnormal vor Behandlungsbeginn, außer:</p> <p>Medulläre Blastenzahl vermindert um ≥50% gegenüber Ursprung, aber weiterhin >5%</p> <p>Zellularität und Morphologie nicht relevant</p>
Medulläre Komplettremission	<p>Knochenmark:</p> <p>≤5% Myeloblasten und Verminderung von ≥50% gegenüber Behandlungsbeginn</p> <p>Peripheres Blut: falls HI* vorliegt, wird es mitnotiert</p>
Stabile Erkrankung	Kein Ansprechen i.S. von mindestens PR, aber ohne Krankheitsprogress für >8 Wochen
Therapieversagen	Tod unter Therapie oder Krankheitsprogress charakterisiert durch

(Failure)	Verschlechterung der Zytopenien, Anstieg in medullären Blasten, oder Progress in eine schwerere MDS FAB Diagnoseklasse als vor Behandlungsbeginn
Rückfall nach Komplett- oder Partialremission	Mindestens eines der folgenden: Erneuter Anstieg auf medulläre Blastenzahl vor Ansprechen Mindestens 50% Verminderung der maximalen Remission /Ansprechen von Neutrophilen oder Thrombozyten Reduktion des Hb von ≥ 1.5 g/dl oder Transfusionsbedürftigkeit
Zytogenetisches Ansprechen	Komplett: Verschwinden von chromosomalen Anomalien ohne Auftreten neuer Anomalien Partiell: Mindestens 50% Reduktion der chromosomalen Anomalien
Krankheitsprogress	Patienten mit: Weniger als 5% Blasten: $\geq 50\%$ Zunahme in Blasten auf $>5\%$ 5%-10% Blasten: $\geq 50\%$ Zunahme in Blasten auf $>10\%$ 10-20% Blasten: $\geq 50\%$ Zunahme in Blasten auf $>20\%$ 20-30% Blasten: $\geq 50\%$ Zunahme in Blasten auf $>30\%$ Oder: Mindestens 50% Verminderung der maximalen Remission/Ansprechen von Neutrophilen oder Thrombozyten Reduktion des Hb von ≥ 2 g/dL Transfusionsbedürftigkeit
Überleben	Endpunkte: Insgesamt: Tod jeglicher Ursache Eventfrei: Therapieversagen oder Tod jeglicher Ursache Progress-freies Überleben: Krankheitsprogress oder Tod durch MDS Krankheitsfreies Überleben: Zeit bis Rezidiv Ursachenspezifischer Tod: Tod in Verbindung mit MDS
*HI	Hämatologische Verbesserung in mindestens einer der drei Zellreihen, sofern abnormal vor Therapiebeginn

Tabelle 5: Überarbeitete IWG-Kriterien (2006) zur Klassifikation von Therapieansprechen in MDS gegenüber 5-Azacytidin (Cheson *et al.*, 2006)

2.3.5.4 Selektive BCL-2-Inhibition durch Venetoclax

Die Familie der B-Cell Lymphoma 2 (BCL-2)-Proteine kann prinzipiell in zwei pro- und eine anti-apoptotische Gruppe unterteilt werden (Cory & Adams, 2002). Das namensgebende Protein BCL-2 bzw. das zugehörige Gen gehört der anti-apoptotischen

Fraktion an und ist in vielen Tumorentitäten überexprimiert, was eine erhöhte Apoptose- und Therapieresistenz zur Folge hat (Bincoletto *et al.*, 1999; Letai, 2008; Maung *et al.*, 1994; Reed, 2008; Scarfo & Ghia, 2013; Vaux, Cory, & Adams, 1988; Yip & Reed, 2008). Auch in den Knochenmarkszellen von MDS-Patienten ist BCL-2 – neben vielen weiteren Proteinen – dereguliert und darüber hinaus zeigt seine Expression eine positive Korrelation zum Krankheitsprogress von Niedrigrisiko- zu Hochrisiko-MDS (Invernizzi *et al.*, 2001; Raza & Galili, 2012).

Anti-apoptotische BCL-2-Proteine besitzen ein gemeinsames Strukturmotiv aus zwei hydrophoben α -Helices, umgeben von sechs oder sieben amphiphoben α -Helices (Souers *et al.*, 2013). Vier der amphiphoben α -Helices bilden eine hydrophobe Furche mithilfe derer pro-apoptotische Proteine an zwei hydrophoben Bindungsstellen gebunden werden können (Souers *et al.*, 2013). 2008 beschrieben Park *et al.* den BCL-2- und BCL-X_L-Inhibitor Navitoclax (ABT-263), der ebendiese hydrophoben Bindungsstellen besetzen kann und so die anti-apoptotische Wirkung von BCL-2 und BCL-X_L blockiert (C.-M. Park *et al.*, 2008). In der klinischen Testung von Navitoclax kam es in Folge der BCL-X_L-Inhibition jedoch zu therapierelevanten, dosislimitierenden Thrombozytopenien (Souers *et al.*, 2013). Die strukturelle Weiterentwicklung der funktionellen Bindungsgruppen führte zum selektiven BCL-2-Inhibitor Venetoclax (ABT-199) (Souers *et al.*, 2013). Dieser bildet durch das Stickstoffatom seiner Indol-Gruppe eine Bindung mit einer Asparaginsäure innerhalb der BH3-Domäne von BCL-2 (Souers *et al.*, 2013). Dies ist ein entscheidender Schritt zur BCL-2 Selektivität, da diese Asparaginsäure in der zentralen BH3-Domäne eine der wenigen strukturellen Unterschiede zu BCL-X_L ist (Souers *et al.*, 2013). Venetoclax besitzt eine subnanomolare Affinität gegenüber BCL-2 ($K_i < 0.010$ nM) bei gleichzeitig über tausendfach niedrigerer Bindungsaffinität gegenüber BCL-X_L ($K_i = 48$ nM) und keiner messbaren Bindungsaffinität zu MCL-1 ($K_i > 444$ nM) (Souers *et al.*, 2013). Somit konnte für Venetoclax das beim strukturverwandten Navitoclax therapielimitierende Risiko einer klinisch relevanten Thrombozytopenie verhindert werden (Souers *et al.*, 2013). Nach ersten erfolgsversprechenden Studien an Patienten mit Chronisch Lymphatischer Leukämie (CLL) (M. A. Anderson *et al.*, 2016) und Akuter Myeloischer Leukämie (AML) (Pan *et al.*, 2014) wurde Venetoclax aufgrund der Häufigkeit von BCL-2-Überexpression in verschiedenen Tumorentitäten als Mono- und Kombinationstherapie getestet. Dabei zeigten sich unter Therapie mit Venetoclax signifikante Zelltodinduktion in den Leukämie-induzierenden Zellen (LIC) von AML-

Patienten sowie den Stamm- und Progenitorzellen von Hochrisiko-MDS-Patienten (Jilg *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2014). In letztgenannten zeigte sich der Effekt zudem unabhängig von zytotoxischen Vorbehandlungen oder vom Vorliegen weiterer ungünstiger Mutationen in MDS-Hochrisikopatienten (Jilg *et al.*, 2016; Reidel *et al.*, 2018). Erste *in vitro* Versuche einer 5-Azacytidin plus Venetoclax-Kombinationstherapie an primären MDS- und AML-Patientenproben zeigten vielversprechende Resultate (Bogenberger *et al.*, 2014).

3 Problemstellung

Myelodysplastische Syndrome sind eine Gruppe von Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzelle und ihrer Mikroumgebung mit dem Risiko einer Transformation in sekundäre Akute Myeloische Leukämien (sAML) (Hofmann W. *et al.*, 2018). Patienten der Niedrigrisikogruppe besitzen prinzipiell eine gute Gesamtprognose, leiden aber dennoch oft unter den begleitenden Zytopenien (Hofmann W. *et al.*, 2018). Zudem unterliegen auch sie dem Risiko genetischen Progresses mit Erwerb ungünstiger Mutationen und einer Transformation in eine sAML über die Zeit (Greenberg *et al.*, 2012). Einzige kurative Option ist aktuell eine Stammzelltransplantation (Hofmann W. *et al.*, 2018).

Die Rolle der Nekroptose und des pro-inflammatorischen Milieus in Pathomechanismus und Progress der Erkrankung ist bisher nicht vollständig verstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Schlüsselproteine RIPK1 und RIPK3 als Regulator zwischen inflammatorischem Überleben und nekroptotischem Absterben der Zellen besser zu verstehen. Weiterhin soll untersucht werden, welche Auswirkung eine Inhibition dieser Proteine auf das kurz- und langfristige Überleben der Knochenmarkzellen hat. Der Betrachtung der CD34⁺/CD45⁺ Stamm- und Vorläuferzellen kommt dabei aufgrund der klonalen Charakteristik der MDS eine besondere Bedeutung zu.

Patienten der Hochrisikogruppe besitzen eine sehr schlechte Prognose (Greenberg *et al.*, 2012). Auch eine Behandlung nach Leitlinienstandard mit 5-Azacytidin erbringt in der Regel keine dauerhafte Remission (Müller-Thomas *et al.*, 2014; Pierre Fenaux *et al.*, 2009). Aufgrund der langsamen Pathogenese der MDS und des meist fortgeschrittenen Alters der Patienten sowie einer erhöhten Prävalenz an Komorbiditäten, kommt eine Stammzelltransplantation häufig nicht in Frage (Hofmann W. *et al.*, 2018). Es werden dringend neue Therapieoptionen mit tolerablem Risikoprofil benötigt. Die Apoptoseresistenz vieler maligner Krebsentitäten aufgrund zunehmender BCL-2-Überexpression lässt sich auch in MDS beobachten (Boudard *et al.*, 2000; Jilg *et al.*, 2016). Der aus der Therapie anderer Malignitäten bereits bekannte selektive BCL-2-Inhibitor Venetoclax zeigte erste vielversprechende Ergebnisse in *in vitro* Behandlungen primärer Knochenmarkzellen von MDS-Patienten (Dill *et al.*, 2020; Jilg

et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit soll eine Kombinationstherapie aus 5-Azacytidin und Venetoclax im Hochrisiko-MDS/sAML in Abhängigkeit von Dosis-abhängigen Nebenwirkungen auf das gesunde Knochenmark getestet werden. Neben kurzfristigen Effekten auf die Viabilität, soll die längerfristige Koloniebildungsfähigkeit der gesunden und erkrankten Zellen unter Kombinationstherapie untersucht werden. Wiederum wird ein Fokus auf die für den Krankheitsprogress relevante Population der CD34⁺/CD45⁺ Stamm- und Vorläuferzellen gelegt. Aufgrund der infausten Prognose und mangelnder therapeutischer Alternativen ist insbesondere das Kollektiv der Patienten mit fehlendem Ansprechen auf 5-Azacytidin Monotherapie („*Failure*“) zu betrachten. Teile der nachfolgenden Experimente und Daten der Versuche mit 5-Azacytidin und Venetoclax sind 2019 in *Experimental Hematology & Oncology* veröffentlicht worden (Jilg *et al.*, 2019).

4 Material und Methodik

4.1 Material

4.1.1 Standardgeräte

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Staat)
Analysenwaage	Sartorius AG (Göttingen, DE)
CO ₂ -Inkubator REVCO Ultima	GS Laboratory Equipment (Ashville, USA)
Digitalwaage	Kern & Sohn GmbH (Tübingen, DE)
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD (Heidelberg, DE)
Fluoreszenzmikroskop BIOREVO BZ-9000	Keyence Deutschland (Neu-Isenburg, DE)
Immunostainer (Leica BOND RXm)	Leica (Wetzlar, DE)
Knochenmühle	Spierings Tissue Processing B.V. (Nijmegen, NLD)
Knochensplitterzange FO602R	Aesculap (Tuttlingen, DE)
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss (Jena, DE)
Neubauer Zählkammer	Reichert (New York, USA)
Netzgerät	Bio-Rad (Hercules, USA)
Magnetisches Zelltrennungssystem MACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, DE)
Sterile Werkbank	Holten (Gydewang, DK)
Varioklav Dampfsterilisator	H&P Labortechnik (Oberschleißheim, DE)
Vortex	Scientific Industries (New York, USA)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, DE)
Zentrifuge Multifuge 3s	Haereus (Hanau, DE)

4.1.2 Standardlösungen

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Staat)
Biocoll Separation Solution	Biochrom AG (Berlin, DE)
Permeabilisations- und Waschpuffer	BD (Heidelberg, DE)
Red Blood Cell Lysis Buffer	Intron Biotechnology (Sangdaewon-dong, Korea)
Trypanblau	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, DE)

4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Staat)
FACS Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Falcon 50ml Röhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Falcon 15ml Röhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Falcon Zellsieb 70yM, 100yM	Falcon (Tewksbury, USA)
Petrischale	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Pipettenspitzen 5ml, 10ml 25ml, 50ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Pipettenspitzen gestopft 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Pipettenspitzen ungestopft 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Zellkulturschale 100	TPP (Trasadingen, DE)
Zellkulturplatten 96-Well, 24-Well, 12-Well, 6-Well	Falcon (Tewksbury, USA)

4.1.4 Chemikalien und biogene Substanzen

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Staat)
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen (Hallbergmoos, DE)
BSA Fraktion V	BioLabs (Ipswich, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, DE)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, DE)
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, DE)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Paraffin	Merck (Darmstadt, DE)
Paraformaldehyd	Melite (Burgdorf, DE)
Phosphat-gepufferte Saline (PBS), 1x	Gibco (Grand Island, USA)

4.1.5 Pufferlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Annexin-V-Binding Puffer (10x)	0.1M Hepes/NaOH, pH 7.4 1.4M NaCl 0.9% 25mM CaCl ₂
FACS-Puffer	1xPBS 3% FCS
MACS-Puffer	1xPBS 0.5% BSA 2mM EDTA

4.1.6 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung (Hersteller, Firmensitz, Staat)
Serumfreies Medium (SFM)	IMDM GlutaMAX (Gibco, Grand Island, USA) 20% BIT 9500 (Stem Cell Technologies, Vancouver, CAN) 100 ng/ml Stem-Cell Factor (R&D Systems, Minneapolis, USA) 5 ng/ml Interleukin-6 (R&D Systems, Minneapolis, USA) 10 ng/ml Interleukin-3 (R&D Systems, Minneapolis, USA) 10 ng/ml Thrombopoetin (R&D Systems, Minneapolis, USA) 10 µM β-Mercaptoethanol (Gibco, Grand Island, USA) 4 µg/ml LDL (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, DE)
MethoCult H4435 enriched	Stemcell Technologies (Vancouver, CAN)

4.1.7 Therapeutika und Inhibitoren

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Staat)
Venetoclax	Abbvie (North Chicago, USA)
5-Azacytidin	Celgene (Summit, USA)
GSK'843A	GlaxoSmithKline plc (Brentford, UK)
Necrostatin-1s	BioVision (Milpitas, USA)

4.1.8 Fertig-Kits

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Staat)
CD34 MicroBeads Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, DE)

4.1.9 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Staat)
Fixable Viability Dye	eBioscience (San Diego, USA)
CD34 Klon 581K	Beckman Coulter (Brea, USA)
CD34 Klon P3.6.2.8.1K	eBioscience (San Diego, USA)
CD45 Klon 2D1	eBioscience (San Diego, USA)
Annexin-V	AG Thomas Kaufman, Universität Bern
7AAD	eBioscience (San Diego, USA)
Fc Receptor Binding Inhibitor	eBioscience (San Diego, USA)
Isotyp Kontrolle (RIPK3)	Cell Signalling Technology (Danvers, USA)
Anti-RIP3	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-RIPK3	Pro Sci Incorporated (San Diego, USA)

4.1.10 Software

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz, Staat)
Microsoft Excel Version 14.1.0	Microsoft (Redmond, USA)
FlowJo Software Version 10.4.1	Tree Star Inc. (Ashland, USA)
GraphPad Prism Version 7.0b	GraphPad Software Inc. (La Jolla, USA)
Adobe Illustrator CS4	Adobe Systems Software (Dublin, Irland)

4.2 Methoden

4.2.1 Patientenproben

Primäre mononukleäre Knochenmarkszellen (*Bone marrow mononuclear cells* (BMMNCs)) wurden aus den Knochenmarkaspiraten von Patienten mit Myelodysplastischen Syndromen (MDS), Chronisch Myelomonozytärer Leukämien (CMML) und sekundären Akuten Myeloischen Leukämien (sAML) isoliert. Die Entnahme des Knochenmarks erfolgte per Punktion aus dem Beckenkamm der betroffenen Patienten im Rahmen der Diagnosestellung oder Verlaufskontrollen. Das schriftliche Einverständnis zur Verwendung des primären Materials zu Forschungszwecken wurde im Einklang mit der Deklaration von Helsinki vor dem

Eingriff eingeholt. Ein Ethikvotum des klinikinternen Ethikkomitees liegt vor (genehmigter Antrag 62/16S). sAML wurde als Blasteninfiltration $\geq 20\%$ im Knochenmark und einer myelodysplastischen oder myeloproliferativen Erkrankung in der Vorgeschichte definiert. Die heparinisierten oder EDTA-vorbehandelten Proben wurden sofort frisch aufgereinigt (4.2.3).

4.2.2 Gesunde Kontrollen

Als gesunde Kontrollen wurden BMMNCs von alterskorrelierten, hämatologisch und onkologisch gesunden Patienten verwendet. Das Knochenmark wurde aus dem Hüftkopf der Patienten nach Entnahme im Rahmen einer Hüft-Totalendoprothesen-Operation im Klinikum rechts der Isar gewonnen. Auch hier wurde vor der Operation das schriftliche Einverständnis der Patienten zur Weiterverwendung für die Diagnostik nicht benötigter Zellen eingeholt. Ein Ethikvotum des klinikinternen Ethikkomitees liegt vor. Mittels Knochensplitterzange bzw. mit Hilfe einer Knochenmühle wurden die Hüftknochen zerkleinert. Anschließend wurden die entstandenen Knochenchips mehrfach mit 1x Phosphat-gepufferter Saline (PBS) gewaschen, um die Zellen aus dem Knochengewölbe zu lösen. Die restliche Aufreinigung erfolgte analog der Aufreinigung der Patientenproben (4.2.3).

4.2.3 Aufreinigung der mononukleärer Knochenmarkzellen

Die in 1xPBS suspendierten Zellen wurden über ein FICOLL-Dichtezentrifugationssystem auf die mononukleäre Fraktion aufgereinigt. Dazu wurde die in 1xPBS suspendierte Zelllösung im Verhältnis 1:1 über eine Biocoll-Lösung geschichtet und bei Raumtemperatur mit 800 g 15 Minuten lang zentrifugiert. Die aufgrund ihrer spezifischen Dichte geformte Schicht der mononukleären Zellen wurde anschließend mit einer Pipette abgenommen. Zur Erhöhung der Reinheit der Zellpopulation wurden im Anschluss mittels Erythrozytenlysepuffer letzte verbleibende rote Blutkörperchen aus dem Zellmaterial entfernt. Die Anzahl viabler Zellen in der Probe wurde nach Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Im Folgenden wurden – sofern nicht anders angegeben – jeweils 5×10^5 viable Zellen pro Ansatz in den Experimenten verwendet. Bei $\geq 10^8$ aufgereinigten Zellen erfolgte eine Anreicherung der CD34⁺ Knochenmarkzellen per Positivselektion mittels Magnetic activated Cell Sorting (MACS) System. Dazu wurde das Zellmaterial in MACS-Puffer suspendiert, nach Herstellerangaben zuerst FcR-Blocking Reagenz und

unmittelbar anschließend CD34-selektive MicroBeads hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei 4°C wurden überflüssige MicroBeads durch Waschung in MACS-Puffer und Zentrifugation bei 300 g für 10 Minuten entfernt. Darauffolgend wurden die Zellen wieder in MACS-Puffer resuspendiert. Es wurde eine LS-Säule an der Magnetwand des MACS-Systems befestigt und mit Pufferlösung gespült. Nun wurden die Zellen langsam durch die mit Stahlwolle gefüllte Säule filtriert. Aufgrund der metallischen Komponente der CD34-selektiven MicroBeads verblieben die so markierten Zellen durch die magnetische Anziehung der MACS-Station im Rahmen dieser Positivselektion innerhalb der Säule. Nicht markierte Zellen wurden im Folgenden dreifach per Pufferlösung vorsichtig aus der Säule gespült. Anschließend wurde die Säule von der Magnetwand entfernt, erneut mit Pufferlösung befüllt und diese durch einen Stempelkolben durch die Säule in ein 15ml Falcon gepresst. So wurden die CD34-markierten Zellen vom Rest der mononukleären Zellen getrennt und analog dieser in den entsprechenden Experimenten verwendet. Entweder erfolgte nun die direkte Färbung intrazellulärer Proteine (4.2.5) oder die Inkubation in Medium und Behandlung mit Therapeutika (4.2.6)

4.2.4 Immunhistochemische Färbung der Proteinexpression von RIPK3

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Pathologie des Klinikums rechts der Isar wurden Knochenmarkstanzbiopsien gesunder Kontrollen und MDS-/sAML-Patienten anonymisiert und retrospektiv auf RIPK3-Proteinexpression analysiert. Die Kohorte erkrankter wie gesunder Stenzen wurde von 2012 bis 2016 im Institut für Pathologie des Klinikums rechts der Isar gesammelt und anonymisiert unter Angabe von Diagnose und Blasteninfiltrationsgrad zur Verfügung gestellt. Die Biopsien wurden in 4% Formalin fixiert, mit EDTA entkalkifiziert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Nach Zuschnitt und Übertragung auf Objektträger wurde das Gewebe per automatischem Immunostainer (Leica BOND RXm) mit anti-RIPK3 nach Herstellerangaben gefärbt und mit Hematoxylin gegengefärbt. Daraufhin erfolgte die Einstufung der Intensität der RIPK3-Proteinexpression durch PD Dr. med. Julia Slotta-Huspenina (Institut für Pathologie des Klinikums rechts der Isar) auf einer Skala von 0 bis 5 Punkten. Dabei wurde neben der Proteinexpression der Blasten auch die physiologische hohe RIPK3-Proteinexpression in der Granulopoese und den Megakaryozyten bzw. die physiologische niedrige Expression in der Erythropoese in die Evaluation miteingeschlossen.

4.2.5 Messung der RIPK3-Proteinexpression im Durchflusszytometer

Zur Messung der intrazellulären Expression des Proteins RIPK3 wurden die frisch aufgereinigten, mononukleären Knochenmarkzellen mit einem Viabilitätsfarbstoff und einem Antikörper für den extrazellulären Stammzellmarker CD34 gefärbt. Daraufhin wurden diese Färbungen per Paraformaldehyd fixiert und mit gekühltem Methanol die Zellen permeabilisiert. Danach erfolgte eine spezifische Färbung auf das Protein RIPK3 bzw. eine Färbung mit der Isotypkontrolle. Anschließend wurden überschüssige Farbstoffe abgewaschen, die Proben am Durchflusszytometer analysiert und die Ergebnisse anschließend per FlowJo Software ausgewertet. Dabei wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aus dem Quotienten von RIPK3-spezifischer Färbung und der Isotypkontrolle errechnet.

4.2.6 Inkubation und Therapeutika-Behandlung

Sofern nicht anders angegeben, wurden jeweils 5×10^5 Zellen pro Milliliter in einer 24-Well-Flatt-bottom-Platte eingesetzt. Die Therapeutika wurden nach Herstellerangaben in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und (sofern nicht anders angegeben) folgendermaßen eingesetzt: Kontrollsubstanz: DMSO 1:1000; RIPK3-Inhibitor GSK'843A 1 μ M, RIPK1-Inhibitor Necrostatin-1s 30 μ M, Venetoclax 1 μ M und 5-Azacytidin 1-10 μ M.

Die gewonnenen mononukleären Knochenmarkzellen wurden in einem serumfreien Kulturmedium unter Zugabe von Wachstumsfaktoren suspendiert und in einem Zellinkubator bei 36°C und 5% CO₂ inkubiert, um ihnen optimale Wachstumsbedingungen zu bieten. Gleichzeitig wurden diese Ansätze mit einem der folgenden Therapeutika/Kontrollstoffe behandelt: DMSO, Necrostatin-1s, GSK'843A, Venetoclax, 5-Azacytidin. Nach 72 Stunden folgte entweder die Zelltodanalyse per Durchflusszytometrie (4.2.7) oder die Kultivierung in Methylcellulose zur Messung der Koloniebildungsfähigkeit (4.2.8).

4.2.7 Zelltodanalyse im Durchflusszytometer

Nach 72 Stunden Inkubation mit den angegebenen Therapeutika wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Ansätze auf die Oberflächenmarker CD34 und CD45 gefärbt, gewaschen und Annexin-V-Färbepuffer, Annexin-V, sowie 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) zur Zelltodbestimmung beigemischt. Nach zehn

(Annexin-V) bzw. fünf Minuten (7-AAD) Inkubationszeit wurden die Ansätze direkt im Durchflusszytometer analysiert und die Ergebnisse nachfolgend per FlowJo-Software weiter ausgewertet. Nach Ausschluss von Zellfragmenten und Dubletten wurde die verbleibende Population der Annexin-V und 7-AAD doppeltnegativen Zellen der kompletten aufgenommenen Zellzahl bzw. der CD34&45 doppeltpositiven Population unter Therapeutikabehandlung als viabel abgegrenzt und der Quotient zur gleichen Population unter DMSO-Behandlung gebildet. So konnte die Viabilität der verbliebenen Zellen nach 72 Stunden unter Behandlung im Vergleich zu einer nicht-toxischen Kontrolle evaluiert werden.

4.2.8 Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit in der Methylcellulose

Nach 72 Stunden Inkubation unter Therapeutikabehandlung wurden die Zellen zweifach mit 1xPBS gewaschen. Daraufhin erfolgte nach Färbung mit Trypanblau die Zählung der verbliebenen viablen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer. 2×10^4 viable Zellen wurden entsprechend den Herstellerangaben in Methylcellulose unter Zugabe von IMDM+GlutaMAX suspendiert. Anschließend erfolgte die Ausplattierung in Petrischalen in Duplikaten, sodass ein Ansatz 10^4 viablen Zellen entsprach. Nach 10-14 Tagen wurden die Vorläufer-Kolonien mikroskopiert und in folgende Subtypen differenziert: Burst-forming unit-erythroid (BFU-E), Colony-forming unit–granulocyte-macrophage (CFU-GM) und Colony-forming unit–granulocyte-erythrocyte-monocyte-megakaryocyte (CFU-GEMM).

4.2.9 Statistische Auswertung

Zur Berechnung signifikanter Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den verschiedenen MDS-/CMML-Stadien bzw. der 72h-Viabilität unter Behandlung mit DMSO, GSK'843A oder Necrostatin-1s wurde die einfaktorische Varianzanalyse ANOVA verwendet. Darauffolgend wurden paarweise post-hoc-Vergleiche der Gruppenmittelwerte mit *t*-Tests durchgeführt (Bonferroni-Korrektur). Entsprechende signifikante Mittelwertdifferenzen sind mit 95%-Konfidenzintervall aufgeführt. Die Koloniebildungsanalysen zur Untersuchung des Einflusses einer RIPK1- bzw. RIPK3-Inhibition auf MDS-Zellen wurden statistisch durch gepaarte, zweiseitige Ratio *t*-Tests untersucht. Das Signifikanzniveau wurde bei $p = 0.05$ festgelegt. Es wurde nicht auf multiples Testen korrigiert.

Zur Berechnung signifikanter Unterschiede unter Behandlung mit DMSO, Venetoclax und/oder 5-Azacytidin in der 72h-Viabilitätsmessung und den Koloniebildungsanalysen wurden gepaarte, zweiseitige *t*-Tests untersucht. Zur Analyse der Daten in Abbildung 11a und 12 wurden ungepaarte, zweiseitige *t*-Tests verwendet. Das Signifikanzniveau wurde jeweils bei $p = 0.05$ festgelegt. Es wurde nicht auf multiples Testen korrigiert. Alle statistischen Auswertungen wurden mit GraphPad Prism Version 7.0b durchgeführt.

4.3 Klinische Patientenannotation

4.3.1 Klinische Annotation der untersuchten Patienten in Experimenten zu RIPK1 und RIPK3

Tabelle 6 im Anhang.

4.3.2 Klinische Annotation der untersuchten Patienten in Experimenten zu Venetoclax und 5-Azacytidin

Tabelle 7 im Anhang.

5 Ergebnisse

5.1 Receptor-interacting serine/threonine-protein Kinase 3 als potentieller Biomarker des MDS-Progresses

41 Knochenmarkproben von MDS-/sAML- und CMML-Patienten wurden im Rahmen der Experimente zur Untersuchung der Bedeutung von RIPK3 und RIPK1 und ihrer Modulation für die Entstehung und Modulation der MDS untersucht (Tabelle 6). Die Proben wurden im Rahmen von Knochenmarkpunktionen zur klinischen Diagnosestellung bzw. Verlaufskontrollen gewonnen. 14 gesunde, alterskorrelierte Kontrollproben wurden aus dem Knochenmark explantierter Hüftköpfe von hämatologisch und onkologisch gesunden Patienten gewonnen. Nach Punktion bzw. Hüftkopf-Explantation wurden die Zellen frisch und steril auf die Fraktion der mononukleären Knochenmarkzellen (BMMNCs) aufgereinigt. Sofern aufgrund der Zellzahl möglich, erfolgte eine weitere Selektion auf die Population der CD34⁺ Zellen per MACS-Positivselektion. Unabhängig davon erfolgte in den Messungen der Proteinexpression via Durchflusszytometrie stets die zusätzliche Färbung der Zellen auf CD34⁺ und in den Messungen der Viabilität via Durchflusszytometrie zusätzlich die Färbung auf CD34⁺ und CD45⁺. Die eingesetzte Zellzahl von BMMNCs betrug 5×10^5 . Zur Messung der intrazellulären RIPK3-Proteinexpression wurden die Zellen direkt nach Aufreinigung entsprechend gefärbt und per Durchflusszytometer untersucht (Messzeitpunkt: 0h).

5.1.1 Receptor-interacting serine/threonine-protein Kinase 3 zeigt signifikante Expressionsunterschiede im Progress der Myelodysplastischen Syndrome und ihrem Übergang in die sekundäre Akute Myeloische Leukämie

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, zeigt die derzeitige Literatur, dass das Krebsgeschehen der Patienten mit myeloischen Erkrankungen eng mit Inflammationserscheinungen und abnormer Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine verknüpft ist (Craver *et al.*, 2018; Höckendorf *et al.*, 2016). Im Serum von Patienten mit autoimmunen Erkrankungen sind erhöhte pro-inflammatorische Zytokine messbar und bereits früh beschrieben Studien Fälle von korrelativ auftretenden Autoimmunerkrankungen und MDS/MPN (L. A. Anderson *et*

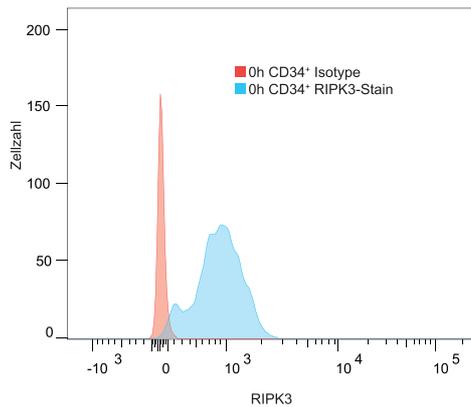
al., 2009; Ganan-Gomez *et al.*, 2015; Guan *et al.*, 2017). Chronische Inflammation schädigt die hämatopoetischen Stammzellen und erschöpft ihre Regenerationsfähigkeit (Chambers *et al.*, 2007). Es wird angenommen, dass das chronisch entzündliche Milieu mutierten, inflammationsresistenten Klonen einen Überlebensvorteil verschafft und ihre Proliferation antreibt (Craver *et al.*, 2018). Zugleich zeigen Ergebnisse der Forschungsgruppe von Professor Dr. med. Philipp J. Jost (III Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München), dass die TNF-abhängige Aktivierung des inflammationsmodulierenden Proteins RIPK3 zu Zelltod der Leukämie-initiiierenden Zellen und Ausdifferenzierung ebendieser führt (Höckendorf *et al.*, 2016). Dies weist auf die tumorsuppressive Wirkung des Proteins und die Bedeutung, hin die sein Verlust im Progress der *de novo* AML spielt (Höckendorf *et al.*, 2016). Da dabei anhand von Genexpressionsdaten gezeigt werden konnte, dass Veränderungen der Expression von RIPK3 auch in MDS auf RNA- und DNA-Ebene stattfinden, stellte sich die Frage, ob sich eine signifikante Veränderung auch auf Proteinebene finden lässt und so Hinweise auf Universalität dieses Mechanismus in myeloiden Erkrankungen gegeben sind. Gleichzeitig zeigt die derzeitige Forschung, dass zum Beispiel initiale Mutationen in Tet Methylcytosine Dioxygenase 2 (*TET2*) in der über 50-jährigen Bevölkerung stark verbreitet sind (Perner *et al.*, 2019). Funktionsverlust von *TET2* erschafft ein subklinisches, pro-inflammatorisches Milieu, welches über die Zeit die Voraussetzung für weitere Mutationen und klonales Wachstum schafft (Perner *et al.*, 2019). Somit bleibt die abschließende Frage nach der gegenseitigen Beeinflussung onkogener Mutationen und eines pro-inflammatorischen Milieus weiter offen.

Aufgereinigte, mononukleäre Knochenmarkzellen hämatologisch gesunder Kontrollpersonen und erkrankter Patienten wurden intrazellulär auf RIPK3-Proteinexpression in der gesamten Population der mononukleären Zellen des Knochenmarks (BMMNCs) und der Population der CD34⁺ Stamm-/Vorläuferzellen gefärbt (Abbildung 2). Dabei erfolgte die Gruppierung der Patienten in frühes und spätes MDS. Frühstadium MDS umfasst dabei folgende Erkrankungen: MDS mit multi-/single lineage dysplasia (MDS-MLD, MDS-SLD) & MDS mit multi-/single lineage dysplasia und Ringsideroblasten (MDS-RS-MLD, MDS-RS-SLD). Spätstadium MDS umfasst MDS mit Blastenvermehrung 1 & 2 (MDS-EB1 & MDS-EB2).

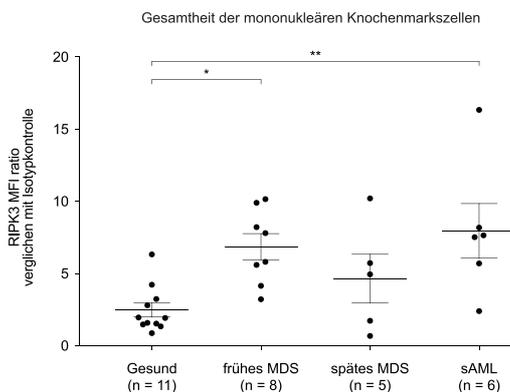
Die RIPK3-Proteinexpression in den frühen Krankheitsstadien zeigte sich dabei in der Population der gesamten BMMNCs signifikant erhöht (Mittelwert: 6.859) im Vergleich mit hämatologisch gesunden, alterskorrelierten Kontrollen (Mittelwert: 2.483; $p = 0.0254$) (Durchschnittsalter aller gesunden Kontrollpersonen: 61.71 Jahre) (Abbildung 2B). Ein Trend zu verminderter RIPK3-Proteinexpression in den späten MDS-Krankheitsstadien ist sichtbar (Mittelwert: 4.662), allerdings nicht signifikant nachweisbar. Ebenso signifikant erhöht im Vergleich zu den gesunden Kontrollproben ist die RIPK3-Expression im Knochenmark der Patienten mit sekundärer Akuter Myeloischer Leukämie (Mittelwert: 7.966; $p = 0.0080$).

Diese Ergebnisse konnten für die Population der CD34⁺ Stamm-/Vorläuferzellen bestätigt werden (Abbildung 2C): Die RIPK3-Proteinexpression erhöhte sich äquivalent zu den Veränderungen in der Population der gesamten BMMNCs vom niedrigen Level in den gesunden Kontrollproben (Mittelwert: 2.682) signifikant zum erhöhten Level in den Frühstadien (Mittelwert: 8.222; $p = 0.0480$) mit breiter Streuung. Erneut zeigte sich ein nicht signifikanter Trend zur Abnahme der Expression in den Spätstadien (Mittelwert: 4.014; Frühes MDS vs. Spätes MDS: $p = 0.4678$). Die Proteinexpression in der Gruppe der sAML-Proben ist ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zu den gesunden Kontrollproben (Mittelwert: 10.56; $p = 0.0024$). Zusammenfassend zeigt sich, dass die RIPK3-Proteinexpression im frühen MDS deutlich erhöht ist und im Progress der Krankheit zu den Spätstadien wieder abnimmt. Im Stadium der sAML kommt es zu einem erneuten Anstieg der RIPK3-Proteinexpression.

A



B



C

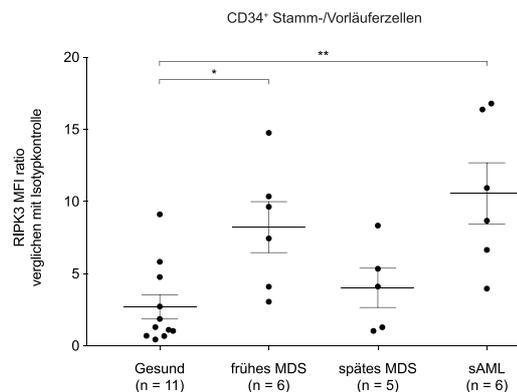


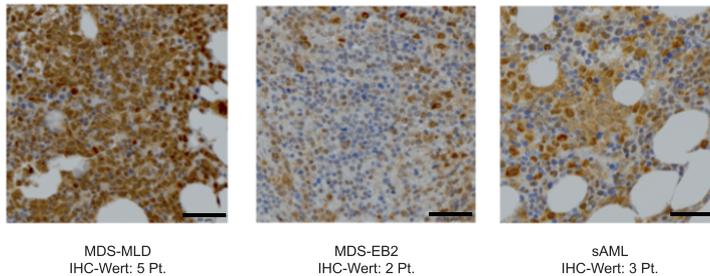
Abbildung 2: RIPK3-Proteinexpression ist in frühen MDS-Stadien und in sAML erhöht

Mononukleäre Knochenmarkszellen wurden intrazellulär auf RIPK3-Proteinexpression gefärbt und per Durchflusszytometrie analysiert. (A) Gezeigt wird die repräsentative RIPK3-Proteinexpressionsmessung in den CD34⁺ Stamm-/Vorläuferzellen per Durchflusszytometrie in einem Patienten mit MDS-RS-MLD. Dabei ist die unspezifische Isotypkontrolle rot und die spezifische RIPK3-Färbung blau gefärbt. (B) Gezeigt wird die MFI der RIPK3-Proteinexpression im Vergleich zur Isotypkontrolle der gesamten mononukleären Knochenmarkszellen von elf gesunden Kontrollpersonen, acht im Frühstadium MDS, fünf im Spätstadium MDS und sechs mit sAML Diagnose. Gezeigt werden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM). ANOVA: 0.0044. Post-hoc *t*-Test in der Abbildung per * angezeigt (Signifikanzniveau: 0.05; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 und *****p* < 0.0001) (C) Gezeigt wird die MFI der RIPK3-Proteinexpression im Vergleich zur Isotypkontrolle der CD34⁺ Stamm-/Vorläuferzellen von elf gesunden Kontrollpersonen, sechs im Frühstadium MDS, fünf im Spätstadium MDS und sechs mit sAML Diagnose. Gezeigt werden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM). ANOVA: 0.0017. Post-hoc *t*-Test in der Abbildung per * angezeigt (Signifikanzniveau: 0.05; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 und *****p* < 0.0001)

Zur Ausweitung der untersuchten Kohorte wurden Schnitte von insgesamt 32 Knochenmarkstanzen immunhistochemisch auf RIPK3-Proteinexpression gefärbt und anschließend analysiert (Scoring durch PD Dr. Slotta-Huspenina) (Abbildung 3): fünf gesunde Kontrollen, neun Patienten mit frühen MDS-Krankheitsstadium (MDS mit multi-/single lineage dysplasia (MDS-MLD, MDS-SLD) & MDS mit multi-/single lineage dysplasia und Ringsideroblasten (MDS-RS-MLD, MDS-RS-SLD)), zehn Patienten mit spätem Krankheitsstadium (MDS mit Blastenvermehrung (MDS-EB1 & MDS-EB2)) und acht mit sAML. Dabei wurde neben der Proteinexpression der Blasten

auch die physiologisch hohe RIPK3-Proteinexpression in der Granulopoese und den Megakaryozyten bzw. die physiologisch niedrige Expression in der Erythropoese in die Evaluation miteingeschlossen (vgl. (Höckendorf *et al.*, 2016)).

A



B

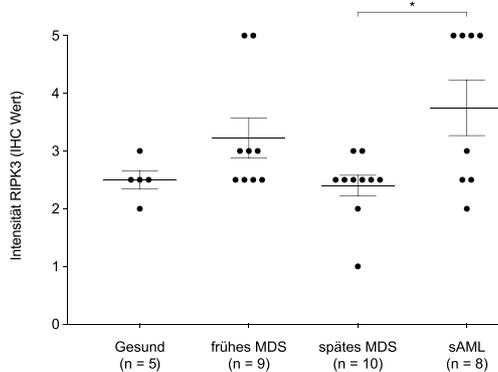


Abbildung 3: RIPK3-Proteinexpression im Knochenmark ist MDS-stadienspezifisch

32 Knochenmarkstanzbiopsien wurden immunhistochemisch auf RIPK3-Proteinexpression gefärbt und mit Hematoxylin gegengefärbt. Anschließend erfolgte die Einstufung der Intensität der Proteinexpression von null bis fünf Punkte. (A) Gezeigt werden repräsentative Schnitte eines MDS-MLD (frühes Krankheitsstadium) mit einer RIPK3-Expression von 5 Punkten im IHC Wert, eines MDS-EB2 (spätes Krankheitsstadium) mit 2 Punkten und einer sAML mit 3 Punkten. (B) Gezeigt wird der immunhistochemische Score (Scoring durch PD Dr. Slotta-Huspenina) von fünf gesunden Kontrollproben, neun im frühen MDS-Krankheitsstadium, zehn im späten MDS-Krankheitsstadium und acht mit sAML-Diagnose. Gezeigt werden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM). ANOVA: 0.0242. Post-hoc *t*-Test in der Abbildung per * angezeigt (Signifikanzniveau: 0.05; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 und *****p* < 0.0001)

Die semi-quantitative Analyse der Schnitte ergab für das gesunde Knochenmark bei geringer Streuung der Ergebnisse einen Durchschnittswert der RIPK3-Proteinexpression von 2.5. Im frühen MDS sind die Werte breiter gestreut und zeigen verglichen mit dem gesunden Knochenmark eine leichte Erhöhung der Proteinexpression (Mittelwert: 3.22; Gesund vs. Frühes MDS: *p* > 0.9999). Im Vergleich dazu zeigten sich dem Krankheitsprogress folgend im späten Stadium – vergleichbar mit den Ergebnissen der Analyse per intrazellulärer Durchflusszytometrie – eine Abnahme der RIPK3-Proteinexpression auf das Niveau der gesunden Kontrollproben (Mittelwert: 2.4; Frühes

MDS vs. Spätes MDS: $p = 0.4103$) und anschließend wiederum eine Erhöhung der Werte bei breiter Streuung im Stadium der sAML (Mittelwert: 3.75). Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied der RIPK3-Proteinexpression im Stadium der sAML im Vergleich zum späten MDS ($p = 0.0325$), nicht jedoch im Vergleich zum gesunden Knochenmark ($p = 0.1662$).

5.1.2 Stadienabhängige RIPK3-Proteinexpression ist auch in der Chronischen Myelomonozytären Leukämie (CMML) nachweisbar

Interessanterweise konnte eine vergleichbare Korrelation zwischen RIPK3-Proteinexpression und Krankheitsprogress auch in der Gruppe der Chronischen Myelomonozytären Leukämien (CMML) gefunden werden (Abbildung 4). Die CMML weist signifikante Überschneidungen in Symptomatik und Histologie zu den MDS auf (Germing *et al.*, 2018). Ebenso transformieren ca. 15-30% aller CMML-Erkrankungen in eine sAML (Germing *et al.*, 2018). Die CMML wird als Teil der MDS/MPN-Gruppe der überarbeiteten WHO-Klassifizierung von 2016 eingestuft (Arber *et al.*, 2016).

Ebenso wie in der Gruppe der MDS-/sAML-Erkrankten zeigte sich in den untersuchten CMML-Knochenmarkproben eine stadienkorrelierte Zunahme der RIPK3-Proteinexpression (Abbildung 4). Diese nahm in den gesamten BMMNCs im frühen CMML-Stadium zu (CMML-1; Mittelwert: 7.063) im Vergleich zu den gesunden Kontrollproben (Mittelwert: 2.483; $p < 0.0001$). Im Progress zur CMML-2 verminderte sich die Expression dann wiederum auf Ausgangsniveau (Mittelwert: 2.265; $p = 0.0003$). Äquivalent stieg ausgehend von niedriger Expression in den gesunden Kontrollproben (Mittelwert: 2.682; $p = 0.0018$) die Proteinexpression in den CD34⁺ Stamm-/Vorläuferzellen des frühen CMML-Stadiums an (Mittelwert: 7.602) (Abbildung 4). Auch in dieser Population nahm die Proteinexpression daraufhin im Spätstadium wieder ab (Mittelwert: 1.975; $p = 0.0023$). In beiden Populationen und Krankheitsstadien ist im Vergleich zu den MDS-Patienten eine wesentlich geringere Streuung der RIPK3-Proteinexpression zu beobachten (Vgl. Abbildung 2 & 3). Zusammenfassend zeigt sich eine stark vergleichbare Dynamik der RIPK3-Proteinexpression in den CMML-Patienten wie auch in den MDS-Erkrankten: Auf eine deutliche Erhöhung der Proteinexpression im Frühstadium der Erkrankung, folgt die Abnahme im Progress zum Spätstadium.

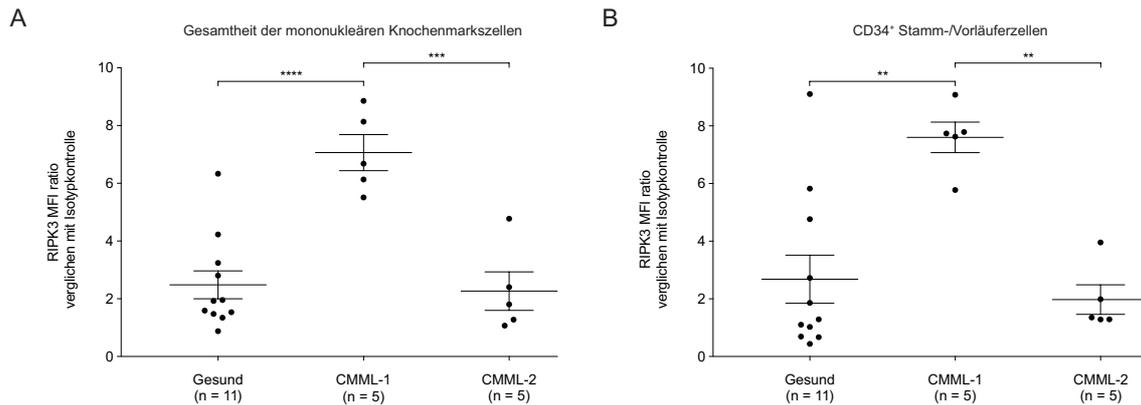


Abbildung 4: RIPK3-Proteinexpression ist erhöht im frühen CMML-Stadium gegenüber gesunden Kontrollproben und späten CMML-Stadium

Mononukleäre Knochenmarkszellen wurden intrazellulär auf RIPK3-Proteinexpression gefärbt und per Durchflusszytometrie analysiert. (A) Gezeigt wird die MFI der RIPK3-Proteinexpression im Vergleich zur Isotypkontrolle der gesamten mononukleären Knochenmarkszellen von elf gesunden Kontrollproben, fünf CMML-1- und fünf CMML-2-Erkrankten. Gezeigt werden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM). ANOVA: 0.0001. Post-hoc *t*-Test in der Abbildung per * angezeigt (Signifikanzniveau: 0.05; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 und *****p* < 0.0001). (B) Gezeigt wird die MFI der RIPK3-Proteinexpression im Vergleich zur Isotypkontrolle der CD34⁺ Stamm-/Vorläuferzellen von elf gesunden Kontrollproben, fünf CMML-1- und fünf CMML-2-Erkrankten. Gezeigt werden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM). ANOVA: 0.0009. Post-hoc *t*-Test in der Abbildung per * angezeigt (Signifikanzniveau: 0.05; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 und *****p* < 0.0001)

5.2 Modulation der Koloniebildungsfähigkeit durch Inhibition von RIPK1 und RIPK3

41 Knochenmarkproben von MDS-/sAML- und CMML-Patienten wurden im Rahmen der Experimente zur Untersuchung der Bedeutung von RIPK3 und RIPK1 und ihrer Modulation für die Entstehung und Modulation der MDS untersucht (Tabelle 6). Die Aufreinigung der Zellen erfolgte analog den Experimenten zur RIPK3-Messung. Die eingesetzte Zellzahl von BMMNCs betrug 5×10^5 in den Flüssigmediumansätzen und 1×10^4 in den Methylcelluloseansätzen. Die Inhibitoren wurden stets wie folgt dosiert: GSK'843A 1 μ M und Nec-1s 30 μ M. Der Messzeitpunkt im Durchflusszytometer zur Zelltodeevaluation nach 72h und die Aussaat in Methylcellulose und konsequente Zählung der gewachsenen Kolonien nach 10-14 Tagen ergab sich aus erfolgreichen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Jilg *et al.*, 2016; Reidel *et al.*, 2018).

5.2.1 RIPK1- und RIPK3-Inhibition zeigen keinen Effekt auf die 72h-Viabilität von MDS-/sAML-Zellen oder gesunden Kontrollproben

RIPK1 und RIPK3 sind zentrale Proteine des regulierten Zelltods und inflammatorischer Prozesse (Green, 2019; Höckendorf *et al.*, 2016; Jost & Hockendorf,

2019; Wagner *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2014). Das stark inflammatorische Knochenmark in frühen MDS-Stadien führt trotz Hyperproliferation über exzessiven Zelltod zu peripheren Zytopenien und zur Akkumulation typischer ungünstiger Mutationen (Ganan-Gomez *et al.*, 2015). Im Progress über die späten MDS-Stadien hin zur sAML scheint die Resistenz gegenüber Zelltod-induzierenden Faktoren jedoch zuzunehmen (Corey *et al.*, 2007; P. Greenberg *et al.*, 1997). Die Hypothese wurde formuliert, dass die initiale Zunahme und der progressive Verlust von RIPK3-Proteinexpression im Verlauf der Erkrankung einen wichtigen Mechanismus des Überlebens und der Resistenzentwicklung der Klone darstellen. Dessen Modulation könnte das Überleben der gesunden Resthämatoopoese und den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen. Entsprechend wurden die Auswirkungen einer spezifischen Inhibition von RIPK1 (durch Nec-1s) und RIPK3 (durch GSK'843A) in MDS und sAML untersucht.

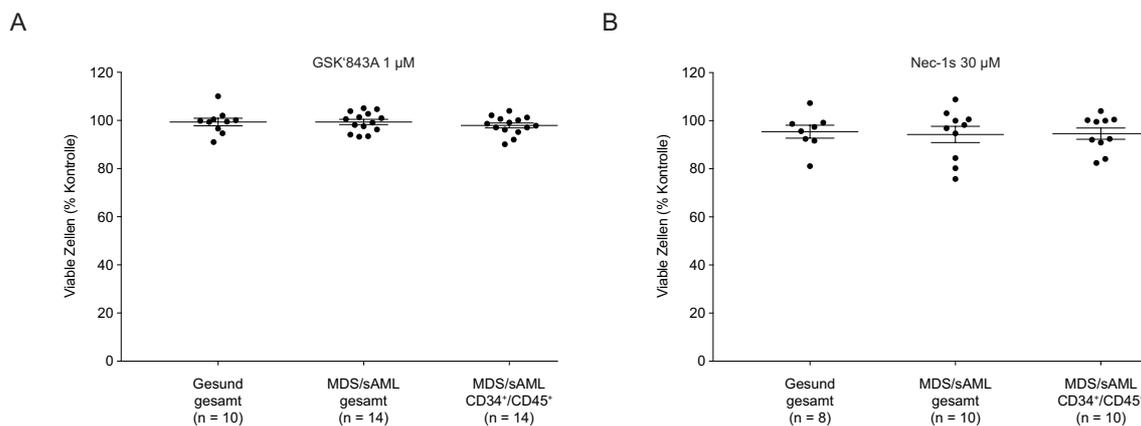


Abbildung 5: RIPK1- und RIPK3-Inhibition hat keine kurzfristigen, zytotoxischen Auswirkungen auf die Viabilität von gesunden Kontrollproben und erkrankten MDS-/sAML-Zellen

Die Viabilität der gesamten Population mononukleärer Knochenmarkszellen („Gesamt“), sowie der CD34⁺/CD45⁺ Stamm-/Vorläuferzellen („CD34⁺/CD45⁺“), wurde jeweils mittels 7AAD plus Annexin-V Färbung in der Durchflusszytometrie ermittelt. Jeder Punkt repräsentiert den Quotient aus viablen Zellen unter Inhibitor-Behandlung und viablen Zellen unter DMSO-Kontrolle. (A) Mononukleäre Knochenmarkszellen von zehn gesunden Kontrollproben und vierzehn kranken MDS-/sAML-Patienten wurden für 72h mit GSK'843A (1 µM) oder der Kontrollsubstanz DMSO (1:1000) behandelt. Gezeigt werden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM). ANOVA: 0.6126. (B) Mononukleäre Knochenmarkszellen von acht gesunden Kontrollproben und zehn kranken MDS-/sAML-Patienten wurden für 72h mit Nec-1s (30 µM) oder der Kontrollsubstanz DMSO (1:1000) behandelt. Gezeigt werden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM). ANOVA: 0.9612.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse nach 72h Behandlung der Zellen zeigen weder in den gesunden Kontrollproben noch in MDS-/sAML-erkrankten Zellen signifikante Auswirkungen der Behandlung mit 1 µM GSK'843A oder 30 µM Nec-1s auf die Viabilität der Zellen (Abbildung 5). Dies gilt sowohl für die Gesamtpopulation

der mononukleären Knochenmarkzellen als auch für die Population der CD34⁺/CD45⁺ Stamm-/Vorläuferzellen. Es traten wie erwartet keine unerwünschten zytotoxischen Effekte im gesunden Knochenmark auf. Auffällig ist eine insgesamt dezent breitere Streuung der Viabilitätswerte unter Nec-1s-Behandlung in allen drei Populationen im Vergleich zu den Werten unter GSK'843A-Behandlung.

5.2.2 RIPK1- und RIPK3-Inhibition zeigen keine langfristigen zytotoxischen Effekte auf die Koloniebildungsfähigkeit gesunder BMMNCs

Wie bereits gezeigt (5.1.1.), verändert sich die Proteinexpression des sowohl im Nekroptose-Signalweg als auch im inflammatorischen Geschehen zentralen Proteins RIPK3 im Progress der Krankheit signifikant. Eine Korrelation zur MDS-typischen Knochenmarkinflammation und zu hohen Zelltodraten in den frühen Krankheitsstadien liegt nahe. Folglich stellte sich die Frage, ob die Inhibition dieses Proteins bzw. des Partnerproteins RIPK1 die Koloniebildungsfähigkeit der gesunden Resthämatopoese verbessern und somit langfristig zu einem besseren klinischen Bild der Patienten beitragen kann. Es sollte untersucht werden, ob die Inhibition von RIPK1 und RIPK3 und folglich der von ihnen vermittelten Inflammation bzw. Zelltod zu einer Zunahme der Vorläuferkolonien auf Basis der gesunden Resthämatopoese führen würde.

Nach 72h Inkubation mit 1 μ M GSK'843A, 30 μ M Nec-1s, oder 1:1000 DMSO in Flüssigmedium wurden die Zellen gewaschen und in Ansätzen zu je 1×10^4 in mit Wachstumsfaktoren versetzter Methylcellulose ausgesät. Dieses semisolid Medium bzw. dieser Versuchsaufbau erlaubt die Untersuchung der Stärke und Diversität der Koloniebildungsfähigkeit der darin ausgesäten Stamm-/Vorläuferzellen. Hierzu wird das Medium zusätzlich mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen versetzt und die Zellen darin suspendiert. Kolonien-bildende Zellen – so genannte Colony forming cells (CFCs) – werden so dazu angeregt zu proliferieren und sich zu differenzieren. Nach einer Wachstumszeit unter optimalen Bedingungen im Inkubator lassen sich Kolonien – Colony forming units (CFUs) – auszählen. Diese entstehen aus signifikanter Zellproliferation einer oder mehrerer CFCs, folglich der Begriff „Unit“. Morphologisch können folgende Kolonien differenziert werden: Colony-forming unit-granulocyte-macrophage (CFU-GM), Burst-forming unit-erythroid (BFU-E) und Colony-forming unit-granulocyte-erythrocyte-monocyte-megakaryocyte (CFU-GEMM). CFU-GM bestehen aus mindestens 20 Granulozyten und Makrophagen, BFU-E aus erythroiden Vorläuferzellen und CFU-GEMM aus Erythroblasten und mindestens zwei weiteren

Zellreihen. Es wurden jeweils 1×10^4 Zellen pro Platte in Duplikaten ausgesät. Nach 10-14 Tagen erfolgte die manuelle Auszählung und Differenzierung in die Koloniesubtypen per Lichtmikroskop.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie zum Überleben der Zellen nach 72h Behandlung (Abbildung 5), zeigten sich auch in den längerfristigen Analysen der Koloniebildungsfähigkeit von insgesamt acht gesunden Kontrollproben keine signifikanten Effekte der RIPK1- und RIPK3-Inhibierung durch $1 \mu\text{M}$ GSK'843A bzw. $30 \mu\text{M}$ Nec-1s im gesunden Knochenmark (Abbildung 6). Auch der Anteil der einzelnen Kolonietypen an der Gesamtzahl der gezählten Kolonien veränderte sich nicht signifikant (Abbildung 6).

Jedoch zeigen sich bei näherer Betrachtung in der Hälfte der einzelnen, alterskorrelierten Kontrollproben deutliche Anstiege der Gesamtkoloniezahl unter Behandlung mit $30 \mu\text{M}$ Nec-1s (#3, #4, #5, #6), dagegen nahmen sie in zwei Kontrollproben deutlich ab (#7, #8) (Abnahme um 55.17% bis Zunahme um 49.56%; Durchschnitt gesamt: Zunahme um 19.27%) (Abbildung 6B). Zu bemerken ist, dass es sich bei diesen beiden um die mit Abstand ältesten gesunden Kontrollpersonen handelt (77 & 81 Jahre; Durchschnittliches Alter aller gesunden Kontrollpersonen: 61.71 Jahre), bei gleichzeitig hoher Standardabweichung (Tabelle 6). Auch wenn diese Beobachtungen in der Zusammenfassung der Daten nicht signifikant ist, stellt sie eine wichtige Beobachtung in Bezug auf die Ergebnisse der parallelen Experimente mit Zellen von MDS-/sAML-Patienten dar (Abbildung 8; Diskussion).

Die Veränderungen der Gesamtkoloniezahl unter GSK'843A-Behandlung sind dagegen weniger variabel. Es zeigt sich ein nicht signifikanter Trend zur Abnahme der Gesamtkoloniezahl durch vier gesunde Kontrollen mit deutlicher Abnahme der Koloniezahl (#2, #3, #6, #7) und vier Kontrollen ohne stärkere Veränderung (#1, #4, #5, #8) (Abnahme um 43.42% bis Zunahme um 12.18%; Durchschnitt gesamt: Abnahme um 16.34%) (Abbildung 6D). Diesen Beobachtungen konnten keine Korrelationen zu Alter oder Geschlecht der gesunden Kontrollpersonen zugrunde gelegt werden (Tabelle 6).

Ergebnisse

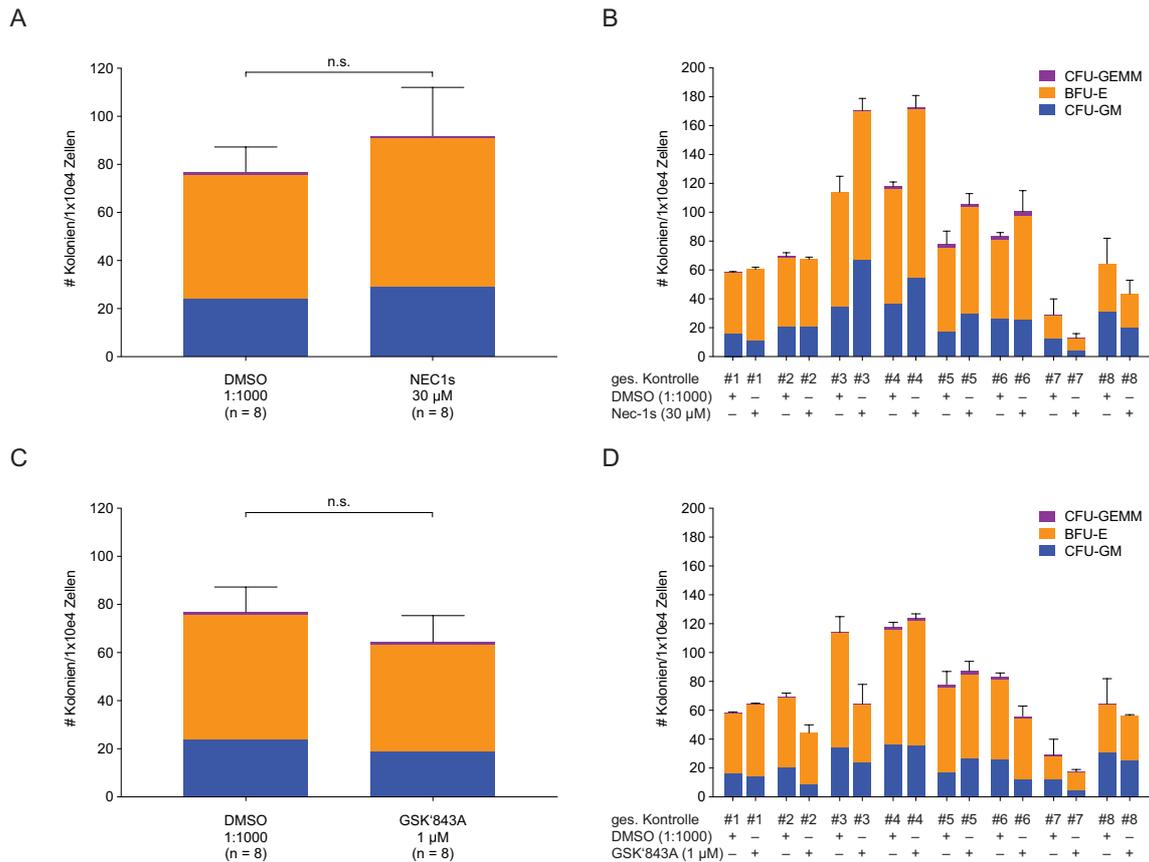


Abbildung 6: RIPK1- und RIPK3-Inhibition haben keinen signifikanten inhibitorischen oder supportiven Effekt auf die Koloniebildungsfähigkeit des gesunden Knochenmarks

Acht gesunde Kontrollen wurden 72h lang in flüssigem Medium mit 1 μ M GSK'843A, 30 μ M Nec-1s, oder 1:1000 DMSO als Kontrollansatz behandelt, gewaschen und anschließend 10^4 viable Zellen pro Ansatz in Duplikaten in Methylcellulose ausgesät. Nach 10-14 Tagen wurden die Kolonien gezählt und in die drei Kolonietypen CFU-GM (Blau), BFU-E (Orange) und CFU-GEMM (Violett) differenziert. Die Auflistung erfolgte aufsteigend nach Alter der Patienten (Durchschnittsalter aller gesunden Kontrollpersonen: 61.71 Jahre). (A) Gezeigt werden jeweils die gemittelten gesamten Koloniezahlen aller acht gesunden Kontrollproben unter DMSO 1:1000 bzw. Nec-1s 30 μ M, farblich differenziert in die drei Kolonietypen CFU-GM (Blau), BFU-E (Orange) und CFU-GEMM (Violett) und die Standardabweichung des Mittelwerts der Gesamtkoloniezahl (SEM). Gepaarter, zweiseitiger Ratio *t*-Test: 0.9496 (Signifikanzniveau: 0.05). (B) Gezeigt werden jeweils die gesamten Koloniezahlen der einzelnen gesunden Kontrollproben, differenziert in die drei Subtypen BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM und die Standardabweichung des Mittelwerts der Gesamtkoloniezahl (SEM) unter Behandlung mit DMSO 1:1000 oder Nec-1s 30 μ M. (C) Gezeigt werden jeweils die gemittelten gesamten Koloniezahlen aller acht gesunden Kontrollproben unter DMSO 1:1000 bzw. GSK'843A 1 μ M, farblich differenziert in die drei Kolonietypen CFU-GM (Blau), BFU-E (Orange) und CFU-GEMM (Violett) und die Standardabweichung des Mittelwerts der Gesamtkoloniezahl (SEM). Gepaarter, zweiseitiger Ratio *t*-Test: 0.0630 (Signifikanzniveau: 0.05). (D) Gezeigt werden jeweils die gesamten Koloniezahlen der einzelnen gesunden Kontrollproben, differenziert in die drei Subtypen BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM und die Standardabweichung des Mittelwerts der Gesamtkoloniezahl (SEM) unter Behandlung mit DMSO 1:1000 oder GSK'843A 1 μ M.

5.2.3 Die Auswirkung der RIPK3-Inhibition durch GSK'843A auf das Knochenmark von Patienten mit MDS/sAML ist abhängig vom Krankheitsstadium

In der Viabilitäts-Analyse nach 72h unter GSK'843A Behandlung wurden keine kurzfristigen Effekte der Inhibition auf das Überleben der MDS-/sAML-Knochenmarkzellen oder der gesunden Kontrollproben beobachtet (Abbildung 5). Auch in den gesunden Kontrollansätzen der Koloniebildungs-Assays waren die Effekte der RIPK3-Inhibitorbehandlung nicht signifikant (Abbildung 6). Es zeigte sich in keiner der acht gesunden Kontrollproben eine deutliche Zunahme der Koloniezahl nach 10-14 Tagen, hingegen eine leichte Abnahme in 50% der Ansätze (Abbildung 6D).

Bei der genauen Annotation der Patientenproben lassen sich stadienspezifische Unterschiede im Ansprechen auf die RIPK3-Inhibition durch GSK'843A beobachten (Abbildung 7): Drei der acht untersuchten Proben wurden zuvor als Patienten im MDS-Frühstadium (MDS-MLD) diagnostiziert. In allen drei Ansätzen konnte jeweils eine Zunahme der Gesamtkolonienzahl beobachtet werden (Abbildung 7A & 7B). Diese Zunahme variierte in ihrer Größe (Zunahme um 21.88% bis 340.0%; Durchschnitt: Zunahme um 64.4%) und dominanten Subtypus-Ausprägung (Abbildung 7B). Ein Patient mit diagnostiziertem MDS del5q-Syndrom (Abnahme um 61.4%) und zwei Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (MDS-EB1 (Abnahme um 50.0%) und sAML (Abnahme um 38.46%); Durchschnitt: Abnahme um 40.23%) reagierten auf die GSK'843A Vorbehandlung im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit DMSO mit einer deutlichen Abnahme der Kolonien (Abbildung 7C & 7E). Nach DMSO- ebenso wie nach GSK'843A-Vorbehandlung wuchsen in den Methylcellulose-Ansätzen dieser drei Patienten fast ausschließlich CFU-GM Kolonien, sodass der Rückgang in der Gesamtkoloniezahl rein auf diesen Subtypus beschränkt war. Eine Aussage über einen spezifischen Effekt einer GSK'843A Behandlung auf diesen Subtypus lassen diese Ergebnisse allerdings nicht zu (Abbildung 7C & 7E).

Interessanterweise fanden sich unter den acht untersuchten Patienten auch zwei mit Mutationen, deren Auftreten häufig mit dem Vorliegen einer MPN-Erkrankung korreliert ist (Abbildung 7F): eine Janus Kinase 2 (JAK2)-Mutation und ein Ecotropic virus integration site 1 protein homolog (EVI-1)-Rearrangement. Die *JAK2*-Mutation kann in MDS-Patienten im Rahmen eines nicht seltenen MDS/MPN-Overlap-Syndroms auftreten. Ein *EVI-1*-Rearrangement kann neben MDS auch in der AML und beim

Formenkreis der MPN-Erkrankungen auftreten (Smol, 2015). Beide Patienten wurden klinisch-pathologisch als MDS-erkrankt diagnostiziert, jedoch lässt die ungewöhnlich hohe Kolonienzahl in beiden Ansätzen unter 1:1000 DMSO (#7: 67.5 / #8: 67) Zweifel an einer ausschließlichen MDS-Erkrankung im Knochenmark aufkommen, da diese für gewöhnlich nicht über 40 Kolonien unter DMSO (1:1000) bilden (Vgl. Abbildung 7B). Vergleichbare Koloniebildungsfähigkeit findet sich in Koloniebildungsassays von Knochenmarkszellen aus Myeloproliferativen Neoplasien. Da eine Überschneidung der beiden Krankheiten (MDS/MPN-Overlap Syndrom) nicht selten ist, liegt auch in diesen beiden Fällen die Vermutung einer entsprechenden Erkrankung nahe und wird hier angenommen.

Während Patient #7 nach GSK'843A-Vorbehandlung mit einer Abnahme der Kolonienzahl im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit DMSO reagierte, zeigte Patient #8 eine Zunahme nach RIPK3-Inhibition. Eine sinnvolle weiterführende statistische Auswertung lässt die geringe Probenzahl nicht zu.

Ergebnisse

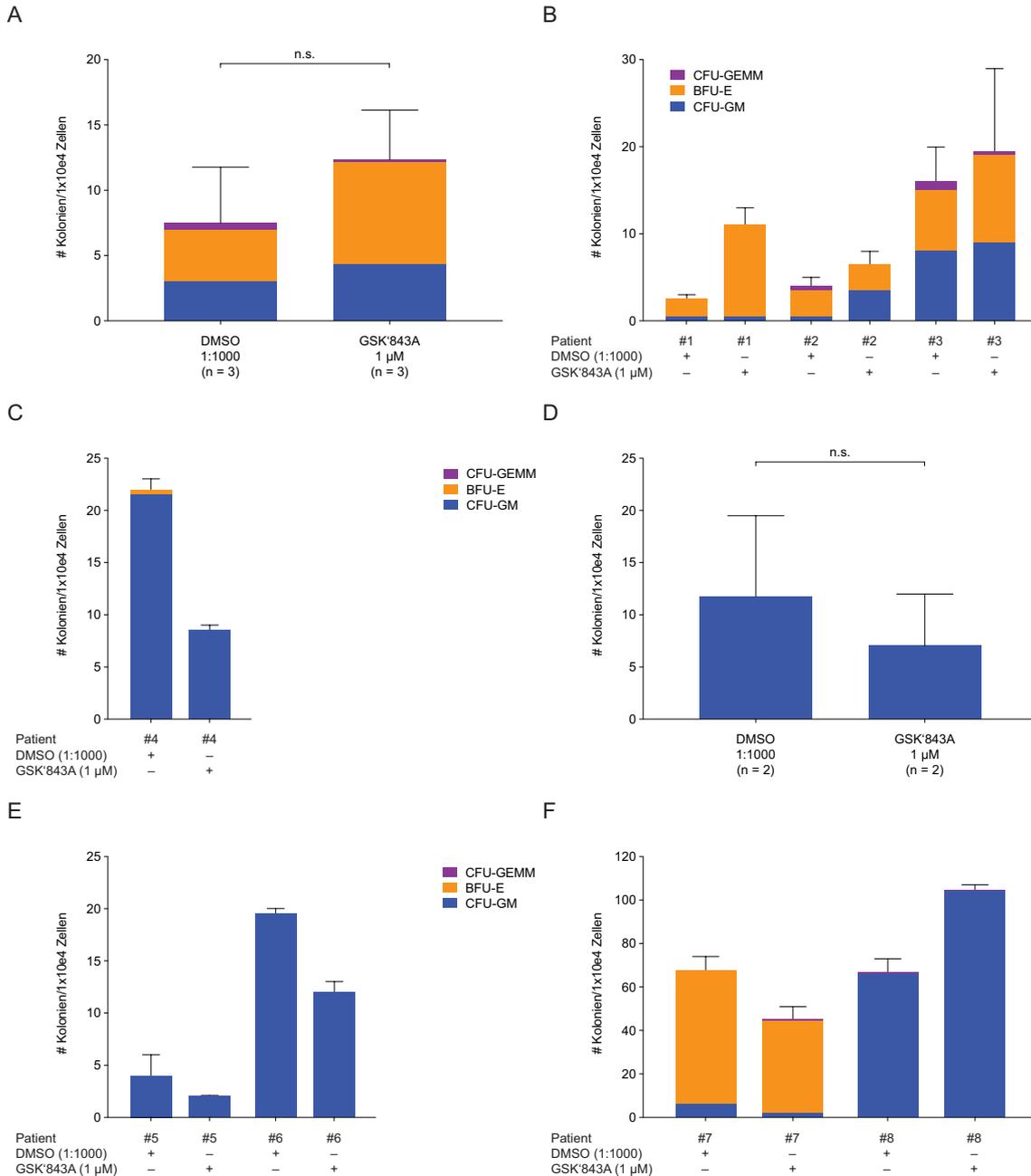


Abbildung 7: Effekte der RIPK3-Inhibition auf das Knochenmark von MDS-/sAML-Patienten sind stadienspezifisch different

Acht Knochenmarkaspirate von MDS-/sAML-/MPN-Patienten wurden nach Aufreinigung für 72h in Flüssigmedium mit dem RIPK3-Inhibitor GSK'843A (1 µM) oder DMSO (1:1000) als Kontrollansatz behandelt und anschließend 10^4 viable Zellen pro Ansatz in Duplikaten in Methylcellulose ausgesät. Nach 10-14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt und in CFU-GM (Blau), BFU-E (Orange) und CFU-GEMM (Violett) differenziert. (A) Gezeigt werden jeweils die gemittelten gesamten Koloniezahlen dreier MDS-MLD-Patienten unter DMSO 1:1000 bzw. GSK'843A 1 µM, farblich differenziert in die drei Kolonietypen CFU-GM (Blau), BFU-E (Orange) und CFU-GEMM (Violett) und die Standardabweichung des Mittelwerts der Gesamtkoloniezahl (SEM). Gepaarter, zweiseitiger Ratio *t*-Test in der Abbildung per * angezeigt (Signifikanzniveau: 0.05; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 und *****p* < 0.0001): 0.2047. (B) Gezeigt werden jeweils die gesamten Koloniezahlen der einzelnen MDS-MLD-Patienten (Abbildung 7A), differenziert in die drei Subtypen BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM und die Standardabweichung des Mittelwerts der Gesamtkoloniezahl (SEM) unter Behandlung mit DMSO 1:1000 oder GSK'843A 1 µM. (C) Gezeigt werden die gesamten Koloniezahlen eines Patienten mit MDS del5q-Syndrom nach DMSO oder GSK'843A Vorbehandlung, differenziert in die Subtypen BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM). (D) Gezeigt werden jeweils die gemittelten gesamten Koloniezahlen zweier Patienten mit Spätstadium MDS

(Abbildung 7E) unter DMSO 1:1000 bzw. GSK'843A 1 μ M, farblich differenziert in die drei Kolonietypen CFU-GM (Blau), BFU-E (Orange) und CFU-GEMM (Violett) und die Standardabweichung des Mittelwerts der Gesamtkoloniezahl (SEM). Gepaarter, zweiseitiger Ratio *t*-Test in der Abbildung per * angezeigt (Signifikanzniveau: 0.05; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 und *****p* < 0.0001): 0.1001. (E) Gezeigt werden jeweils die gesamten Koloniezahlen der einzelnen Patienten aus Abbildung 7D, differenziert in die drei Subtypen BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM und die Standardabweichung des Mittelwerts der Gesamtkoloniezahl (SEM) unter Behandlung mit DMSO 1:1000 oder GSK'843A 1 μ M. (F) Gezeigt werden jeweils die gesamten Koloniezahlen zweier MDS-Patienten mit MPN-typischer Mutation nach DMSO oder GSK'843A Vorbehandlung, differenziert in die Subtypen BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM).

5.2.4 RIPK1-Inhibition durch Nec-1s erhöht die Koloniebildungsfähigkeit von MDS-/sAML-Stamm-/Vorläuferzellen

Äquivalent zu den gesunden Kontrollproben, wurden 1×10^4 viable, mononukleäre Knochenmarkzellen aus MDS-/sAML-/MPN-Aspiraten nach 72h Vorbehandlung mit dem RIPK1-Inhibitor Nec-1s (30 μ M) und sukzessiver Waschung ausgesät. Nach 10-14 Tagen Wachstum in Methylcellulose wurden die Kolonien mikroskopiert und morphologisch in die Subtypen BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM differenziert.

In der Durchflusszytometrie nach 72h zeigten sich keine Effekte auf das Überleben der erkrankten wie gesunden Zellen unter Nec-1s Behandlung (Abbildung 5). Auch in den gesunden Kontrollansätzen in der Methylcellulose konnten keine signifikanten Effekte auf die Koloniebildungsfähigkeit durch die Inhibitorbehandlung beobachtet werden (Abbildung 6). Es zeigte sich in der Hälfte der gesunden Kontrollproben ein Anstieg der Koloniezahl nach Nec-1s-Behandlung (Abbildung 6B).

In vier Niedrigrisiko- und zwei Hochrisiko-MDS-Proben zeigte sich nach 10-14 Tagen in den mit 30 μ M Nec-1s vorbehandelten Ansätzen eine signifikante Zunahme von Kolonien im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit 1:1000 DMSO (Abbildung 8A & 8C; *p* = 0.0091). Es ist zu beobachten, dass die Zu- bzw. Abnahme der Kolonienzahl unter Nec-1s-Vorbehandlung sich jeweils hauptsächlich auf den Kolonien-Subtypus konzentriert, der auch den Großteil der Gesamtkolonienzahl der einzelnen Patienten unter DMSO bildet. Besteht ein relativ ausgeglichenes Verhältnis der Kolonietypen, verteilt sich die Zunahme ebenfalls relativ ausgeglichen auf alle drei Subtypen. Es scheint keine spezifische Wirkung auf einen einzelnen Kolonietypus zu bestehen. (Abbildung 8). Erneut reagierten die beiden MPN-mutierten Patienten unterschiedlich auf die RIPK1-Inhibition durch Nec-1s (Abbildung 8D): Während Patient #7 nach Nec-1s-Vorbehandlung mit einer Abnahme der Kolonienzahl im Vergleich zur

Kontrollbehandlung mit DMSO reagierte, wies Patient #8 eine deutliche Zunahme nach RIPK1-Inhibition auf. Eine sinnvolle weiterführende statistische Auswertung lässt die geringe Probenzahl auch hier nicht zu.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass die RIPK3-Inhibition durch GSK'843A in den gesunden Kontrollproben keine zytotoxischen Auswirkungen auf das kurzzeitige Überleben bzw. die Koloniebildungsfähigkeit bewirkt. Es wurde eine moderate Abnahme der Gesamtkoloniezahl ohne statistische Signifikanz nachgewiesen. Die äquivalente Vorbehandlung von sechs MDS-Patienten offenbarte stadienspezifische Effekte der RIPK3-Inhibition in den Koloniebildungsassays. So reagierten drei Niedrigrisiko-Patienten mit einer Zunahme von Kolonien, während sie in zwei Hochrisiko- und einem del5q-mutierten Patienten abnahmen. Die Effekte auf potentielle MDS/MPN-Overlap Erkrankungen bedürfen einer höheren Fallzahl, um ausreichend evaluiert zu werden. Somit ist eine exakte Differenzierung der Patienten anhand ihrer diagnostischen und klinischen Annotation essentiell für das Verständnis der Effekte einer RIPK3-Inhibition auf die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen. Ein Umstand, der sich auch anhand der untersuchten Unterschiede der stadienabhängigen RIPK3-Proteinexpression ableiten lässt.

Die Inhibition von RIPK1 durch Nec-1s zeigte im gesunden Knochenmark eine leichte Zunahme der Kolonienzahl. Die Effekte auf das erkrankte Knochenmark waren im Unterschied zur RIPK3-Inhibition durch GSK'843A nicht stadienspezifisch: In allen sechs untersuchten Knochenmarkproben führte eine Nec-1s Behandlung nach 10-14 Tagen zu signifikant mehr Kolonien, vergleichbar mit dem leicht positiven Trend der gesunden Kontrollproben, während in zwei Patienten mit MPN-typischen Mutationen bisher uneindeutige Effekte zu beobachten waren.

Ergebnisse

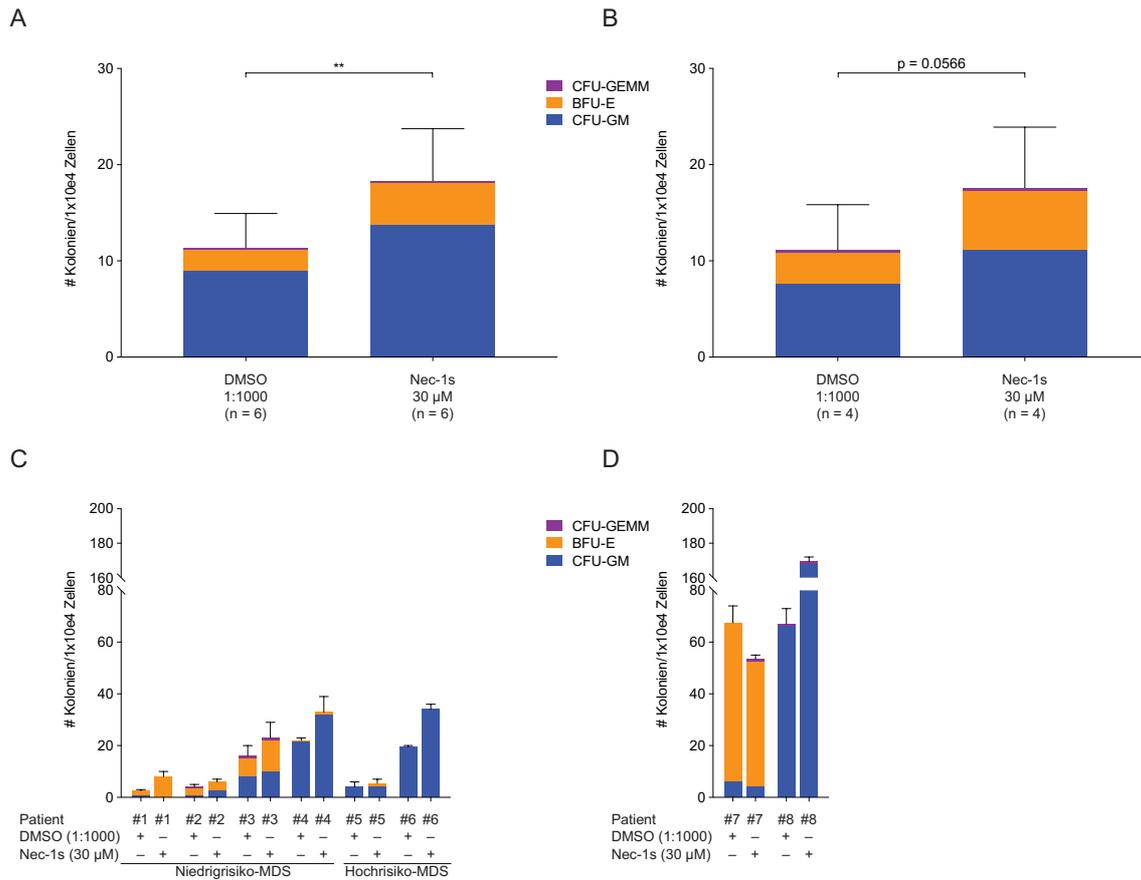


Abbildung 8: RIPK1-Inhibition verbessert die Koloniebildungsfähigkeit in MDS-/sAML-Knochenmark

Knochenmarkspirate von acht Patienten wurden nach Aufreinigung 72h lang in Flüssigmedium mit dem RIPK1-Inhibitor Nec-1s (30 μ M), oder DMSO (1:1000) als Kontrollansatz behandelt. Anschließend wurden 10^4 viable Zellen pro Ansatz in Duplikaten in Methylcellulose ausgesät. Nach 10-14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt und in CFU-GM (Blau), BFU-E (Orange) und CFU-GEMM (Violett) differenziert. (A) Gezeigt werden jeweils die gemittelten gesamten Koloniezahlen aller sechs MDS-/sAML-Patienten (Vgl. Abbildung 8C) unter DMSO 1:1000 bzw. Nec-1s 30 μ M, farblich differenziert in die drei Kolonietypen CFU-GM (Blau), BFU-E (Orange) und CFU-GEMM (Violett) und die Standardabweichung des Mittelwerts der Gesamtkoloniezahl (SEM). Gepaarter, zweiseitiger Ratio *t*-Test in der Abbildung per * angezeigt (Signifikanzniveau: 0.05; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ und **** $p < 0.0001$): 0.0091. (B) Gezeigt werden jeweils die gemittelten gesamten Koloniezahlen aller vier Niedrigrisiko-MDS-Patienten (#1-#4: Vgl. Abbildung 8C) unter DMSO 1:1000 bzw. Nec-1s 30 μ M, farblich differenziert in die drei Kolonietypen CFU-GM (Blau), BFU-E (Orange) und CFU-GEMM (Violett) und die Standardabweichung des Mittelwerts der Gesamtkoloniezahl (SEM). Gepaarter, zweiseitiger Ratio *t*-Test in der Abbildung per * angezeigt (Signifikanzniveau: 0.05; $p = 0.0566$). (C) Gezeigt werden jeweils die gesamten Koloniezahlen der einzelnen Patienten aus Abbildung 8A, differenziert in die drei Subtypen BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM und die Standardabweichung des Mittelwerts der Gesamtkoloniezahl (SEM) unter Behandlung mit DMSO 1:1000 oder Nec-1s 30 μ M. (D) Gezeigt werden jeweils die gesamten Koloniezahlen zweier MDS-Patienten mit MPN-typischer Mutation nach DMSO oder Nec-1s Vorbehandlung, differenziert in die Subtypen BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM).

5.3 Venetoclax in Kombination mit 5-Azacytidin als neue, effektive Therapieoption mit enger therapeutischer Breite in MDS/sAML

5-Azacytidin (5-AZA) ist Teil der Gruppe hypomethylierender Substanzen (HMA), die den Goldstandard in der Behandlung von MDS-Patienten mit Hochrisikoklassifizierung bilden, für die eine kurative Stammzelltransplantation nicht in Frage kommt (Hofmann *W. et al.*, 2018; Pierre Fenaux *et al.*, 2009; Silverman *et al.*, 2002). Unter Einsatz von HMA konnte in Studien ein sechs- bis neunmonatiger Überlebensvorteil im Vergleich zu keiner oder einer rein supportiver Therapie beobachtet werden (Pierre Fenaux *et al.*, 2009; Silverman *et al.*, 2002). Aufgrund des unter 5-Azacytidin häufig beobachteten Verlusts des Therapieansprechens ist in den vergangenen Jahren eine Therapie mit BCL2-Inhibitoren allein oder in Kombination mit 5-Azacytidin verstärkt erforscht worden (Bogenberger *et al.*, 2014; Courtney D. DiNardo *et al.*, 2018; DiNardo *et al.*, 2019; C. D. DiNardo *et al.*, 2018; Jilg *et al.*, 2016; Reidel *et al.*, 2018). Die Vorarbeiten der Forschungsgruppe konnten bereits zeigen, dass der BCL2-selektive Inhibitor Venetoclax in translationalen Versuchsaufbauten im Hochrisiko-MDS – auch ungeachtet ungünstiger, MDS-typischer Mutationen – zu einer deutlichen Blastenreduktion führen kann, sowie die Koloniebildungsfähigkeit des blasteninfiltrierten Knochenmarks nachhaltig vermindern kann (Jilg *et al.*, 2016; Reidel *et al.*, 2018).

Angelehnt an diese Versuchsaufbauten wurde der Zeitpunkt zur Messung der Viabilität auf 72h nach Behandlungsbeginn festgesetzt. Es wurde insgesamt Material von 21 erkrankten Patienten (Tabelle 7) und 19 hämatologisch/onkologisch gesunden, alterskorrelierten Kontrollpersonen verwendet. Dieses wurde von den Patienten im Rahmen der Diagnosestellung bzw. von Verlaufskontrollen aus Knochenmarkpunktaten gewonnen. Gesunde Zellen wurden extrahiert aus dem Knochengewölbe von Hüftköpfen, die im Rahmen einer Hüft-Totalendoprothese-Implantation entnommen wurden (Durchschnittsalter 64.96 Jahre). Die Proben wurden auf die Population der mononukleären Knochenmarkzellen aufgereinigt und in den entsprechenden Versuchsaufbauten weiterverarbeitet. Es handelt sich bei MDS um eine klonale Erkrankung der hämatopoetischen Stammzelle, ausgehend von einem oder mehreren mutierten Klonen mit dysplastisch differenzierten Zellen (Woll *et al.*, 2014). Aufgrund dessen ist die Untersuchung der Behandlungseffekte nicht nur in der Gesamtheit der mononukleären Zellen (BMMNC), sondern speziell auch in der Population der CD34⁺ Stamm-/Vorläuferzellen, die zu großen Teilen die MDS-induzierende Blastenpopulation

mit umfasst, essentiell (Maher Albitar *et al.*, 2002; Pang *et al.*, 2013; Jane E. Parker *et al.*, 2000; Woll *et al.*, 2014). Hierzu wurde ebendiese Population jeweils in den erkrankten wie gesunden Proben spezifisch mit einem CD34-selektivem und CD45-selektivem Antikörper gefärbt und anschließend die Viabilität unter Venetoclax oder 5-Azacytidin bzw. der DMSO-Kontrolle in den BMMNCs, sowie der Population der Stamm-/Progenitorzellen per Durchflusszytometer bestimmt. Teile der nachfolgenden Experimente und Daten der Versuche mit 5-Azacytidin und Venetoclax wurden 2019 in *Experimental Hematology & Oncology* veröffentlicht (Jilg *et al.*, 2019).

5.3.1 Einzel- und Kombinationsbehandlung mit niedrig dosiertem 5-Azacytidin und Venetoclax zeigen keine kurzzeitige Toxizität im gesunden Knochenmark

Um zur Anwendung in MDS-erkrankten Patienten in Betracht zu kommen, muss vorweg eine mögliche, relevante Belastung der gesunden Resthämatopoese durch 5-Azacytidin und Venetoclax anhand gesunder Kontrollen ausgeschlossen werden. Hierzu wurden Knochenmarkzellen aus den Hüftköpfen hämatologisch/onkologisch gesunder, alterskorrelierter Patienten gewonnen. Da sich Milieu und Funktionskapazität gesunder Knochenmarkzellen mit dem Altersprogress verändern, ist es von essentieller Bedeutung, zum durchschnittlichen MDS-Erkrankungsalter (75 Jahre, im hier untersuchten Kollektiv: 72.14 Jahre) alterskorrelierte, gesunde Kontrollen zu verwenden (in den hier gezeigten Experimenten: 64.96 Jahre) (Chatta *et al.*, 1994; Eisenstaedt, Penninx, & Woodman, 2006; Ershler *et al.*, 2005; Hofmann W. *et al.*, 2018). Da das gesunde Knochenmark nur eine Stamm-/Vorläuferzellen-population von <5% in den mononukleären Zellen aufweist (Federica Servida *et al.*, 1996), wurden Teile der aufgereinigten Knochenmarkzellen zusätzlich per MACS-System auf CD34⁺ positivselektiert und eine Färbung auf CD34⁺/CD45⁺ durchgeführt.

Die Zellen wurden nach ihrer Aufreinigung für 72 Stunden in Flüssigmedium mit Venetoclax, 5-Azacytidin oder der Kombination aus beiden behandelt und anschließend per Durchflusszytometer auf Zelltodinduktion untersucht. In der Gesamtheit der mononukleären Knochenmarkzellen zeigte sich keine oder nur moderate und tolerable Zelltodinduktion unter 1 µM Venetoclax-Einzelbehandlung, 1-10 µM 5-Azacytidin-Einzelbehandlung und der Kombinationsbehandlung aus Venetoclax 1 µM und 5-Azacytidin 1 µM im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit DMSO 1:1000 (Abbildung 9A). Jedoch wiesen die Kombinationsbehandlungen aus Venetoclax 1 µM und jeweils 5

μM , 7.5 μM oder 10 μM 5-Azacytidin im Vergleich zur Kontrollbehandlung in den BMMNCs eine starke, signifikante Zelltodinduktion auf (Abnahme um 44.8% bis 59.5%) und gaben so erste Hinweise auf eine erhöhte Knochenmarktoxizität der höheren Kombinationsdosen (Abbildung 9A). Die niedrigen Dosen Venetoclax 1 μM und 5-Azacytidin 1 μM in Einzel- und Kombinationsbehandlung zeigten auch in der Population der $\text{CD34}^+/\text{CD45}^+$ Stamm-/Vorläuferzellen keine relevant starke Zelltodinduktion (Abbildung 9B). Hingegen wiesen alle Dosierungen von 5-Azacytidin ab 5 μM bis 10 μM in Einzel- (Abnahme um 61.8% bis 79.5%) und mehr noch in Kombinationsbehandlung mit 1 μM Venetoclax (Abnahme um 86.4% bis 90.1%) starke, signifikante Zelltodinduktion im gesunden $\text{CD34}^+/\text{CD45}^+$ Knochenmark auf. Somit ließ sich feststellen, dass eine Behandlung mit 5-Azacytidin einzeln oder in Kombination mit Venetoclax 1 μM bereits ab einer Dosierung von 5 μM für 72 Stunden eine starke Zelltodinduktion im gesunden Knochenmark, speziell der Stamm-/Vorläuferpopulation auslöst. Niedrige Dosierung von Venetoclax 1 μM und 5-Azacytidin 1 μM in Einzel- wie Kombinationsbehandlung dagegen bewirken keine kurzzeitige Zelltodinduktion im gesunden Knochenmark.

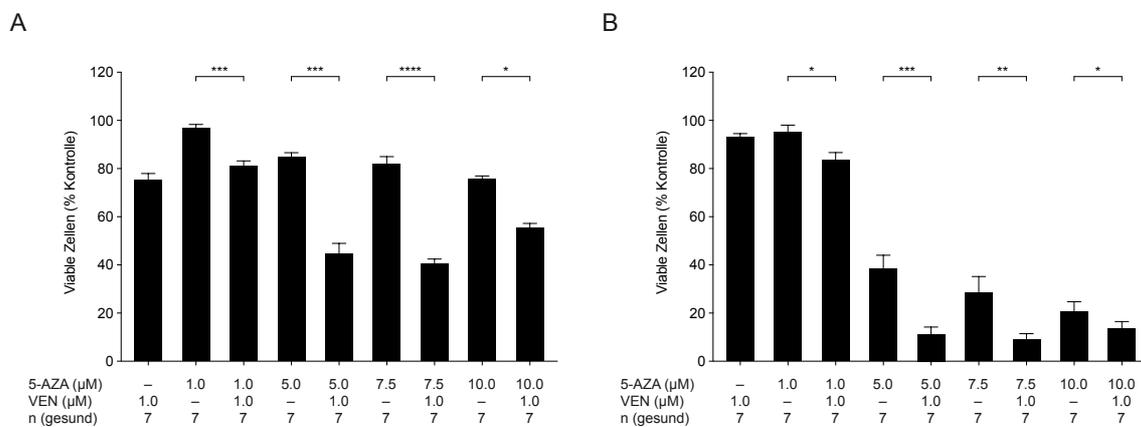


Abbildung 9: 72h Toxizität der Kombinationsbehandlung aus Venetoclax und 5-Azacytidin ist dosisabhängig

BMMNCs von je sieben gesunden, alterskorrelierten Kontrollpersonen wurden aus Hüftköpfen aufgereinigt und mit Venetoclax, 5-Azacytidin oder der Kombination aus beiden in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Per 7-AAD und Annexin-V Färbung im Durchflusszytometer wurde die Viabilität der Gesamtheit der BMMNCs (A) und der $\text{CD34}^+/\text{CD45}^+$ Stamm-/Vorläuferpopulation (B) gegen eine DMSO-Kontrolle gemessen. Gezeigt werden jeweils der Durchschnitt des Quotienten aus Therapeutikum und DMSO-Kontrolle und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM). Ausgewählte Signifikanzen per gepaartem, zweiseitigem *t*-Test in der Abbildung per * angezeigt (Signifikanzniveau: 0.05; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ und **** $p < 0.0001$). In Teilen vorveröffentlicht (Jilg *et al.*, 2019).

5.3.2 Niedrigdosierte Einzel- und Kombinationsbehandlung aus Venetoclax und 5-Azacytidin induzieren keine signifikante Veränderung der Koloniebildungsfähigkeit gesunder Knochenmarkzellen

Noch deutlicher war dieser Effekt in den Koloniebildungsassays zu beobachten. Aufgrund des klonalen Charakters der MDS-Erkrankung kommt der Unterdrückung der malignen Klone und ihrer proliferierenden Stamm-/Vorläuferzellen-Population besondere Bedeutung zu. Ebenso wichtig ist der Erhalt einer gesunden Resthämatopoese mit ausreichender Koloniebildungsfähigkeit. Hierzu wurden aufgereinigte BMMNCs zunächst 72h analog der Viabilitätsassays mit Venetoclax und/oder 5-Azacytidin behandelt, gewaschen und anschließend für 10-14 Tage in mit Wachstumsfaktoren versehener Methylcellulose ausgesät und kultiviert. Anschließend wurden die Kolonien morphologisch per Lichtmikroskop ausgezählt und in CFU-GM, CFU-GEMM und BFU-E differenziert.

In den niedrigen Dosen Venetoclax 1 μ M und 5-Azacytidin 1 μ M zeigen sich tolerable, moderate Verminderungen der Kolonienzahl im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit 1:1000 DMSO (Abbildung 10). Auch die Verteilung der Differenzierung in die drei Koloniesubtypen veränderte sich nicht auffällig. Ebenso verhielt sich die Niedrigdosis Kombinationsbehandlung aus 1 μ M Venetoclax und 1 μ M 5-Azacytidin (Abbildung 10). Jedoch fiel die Koloniezahl mit ansteigender Dosis 5-Azacytidin > 1 μ M sowohl in den Einzel- als auch den Kombinationsbehandlungen mit 1 μ M ABT-19 drastisch und signifikant ab (Abnahme um 77.6% bis 99.4%) (Abbildung 10). Resultierend daraus und den Daten aus den 72h Viabilitätsassays (Abbildung 9A & 9B) ist von einem Einsatz von 5-Azacytidin in Dosierungen über 1 μ M in Einzel- oder Kombinationsbehandlung mit 1 μ M Venetoclax abzusehen, da die Viabilität und Koloniebildungsfähigkeit gesunder Zellen zu stark vermindert wird. Dagegen ist eine Behandlung mit Venetoclax 1 μ M und 5-Azacytidin 1 μ M gut tolerabel, sowohl im Hinblick auf kurzzeitige Zytotoxizität als auch längerfristig die Koloniebildungsfähigkeit betreffend (Abbildung 9 & 10).

A

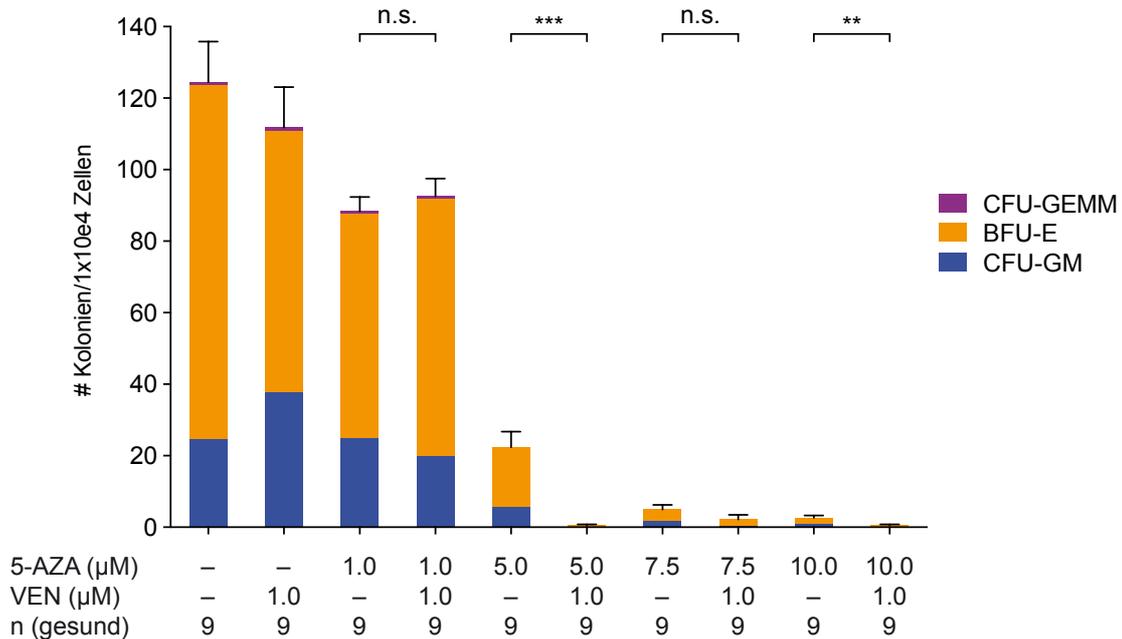


Abbildung 10: Niedrigdosis-Kombinationsbehandlung aus Venetoclax und 5-Azacytidin führt nicht zu Veränderungen der Koloniebildungsfähigkeit gesunder Knochenmarkszellen

BMMNCs von neun gesunden, alterskorrelierten Kontrollen wurden aus Hüftköpfen aufgereinigt und mit Venetoclax, 5-Azacytidin oder der Kombination aus beiden in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Nach 72h erfolgte die Waschung und Aussaat der Zellen zu 1×10^4 pro Ansatz in Duplikaten in mit Wachstumsfaktoren versetzter Methylcellulose. Nach 10-14 Tagen wurden die Kolonien gezählt und in die drei Kolonietypen CFU-GM (Blau), BFU-E (Orange) und CFU-GEMM (Violett) differenziert. Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte der einzelnen Subtypen und die Standardabweichung des Mittelwerts der Gesamtkolonienzahl (SEM) unter den angegebenen Behandlungsvarianten. Ausgewählte Signifikanzen per gepaartem, zweiseitigem *t*-Test in der Abbildung per * angezeigt (Signifikanzniveau: 0.05; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 und *****p* < 0.0001). In Teilen vorveröffentlicht (Jilg *et al.*, 2019).

5.3.3 Niedrigdosis-Kombination aus Venetoclax und 5-Azacytidin induziert effektiv Zelltod in MDS/sAML

In Anbetracht der beobachteten Toxizität hoher Kombinationsdosen in den gesunden Kontrollproben (Abbildung 9 und 10) stellte sich insbesondere die Frage, ob eine tolerable, niedrigdosierte Kombinationsbehandlung aus 1 µM 5-Azacytidin und 1 µM Venetoclax eine effiziente Zelltodinduktion im MDS-/sAML-erkrankten Knochenmark erreichen kann. Hierzu wurden jeweils 8 bis 19 Proben von MDS-/sAML-Patienten analog der gesunden Kontrollproben aufgereinigt. Anschließend erfolgte 72h lang eine Behandlung mit 1 µM oder 10 µM 5-Azacytidin in Einzel- und Kombinationsbehandlung mit 1 µM Venetoclax. Eine niedrigdosierte 5-Azacytidin-Einzelbehandlung konnte keine relevante Zelltodinduktion erreichen, während die Hochdosisgabe von 10 µM 5-Azacytidin erfolgreich zu einem Viabilitätsverlust der

Ergebnisse

Knochenmarkszellen führte (Abnahme um 35.5%) (Abbildung 11A). Interessanterweise konnte eine mit wesentlich weniger Toxizität fürs gesunde Knochenmark – vgl. Abbildung 9 & 10 – assoziierte Niedrigdosis-Kombination aus 1 μM Venetoclax und 1 μM 5-Azacytidin eine ebenso starke Zelltodinduktion erreichen (Abnahme um 39.5%) (Abbildung 11A). Eine Dosiserhöhung von 5-Azacytidin auf 10 μM in der Kombination mit Venetoclax 1 μM führte im Vergleich zu der Niedrigdosis-Kombination zu keinem weiteren signifikanten Behandlungsvorteil in Bezug auf die Zelltodinduktion (Abnahme um 45.3%) (Abbildung 11A).

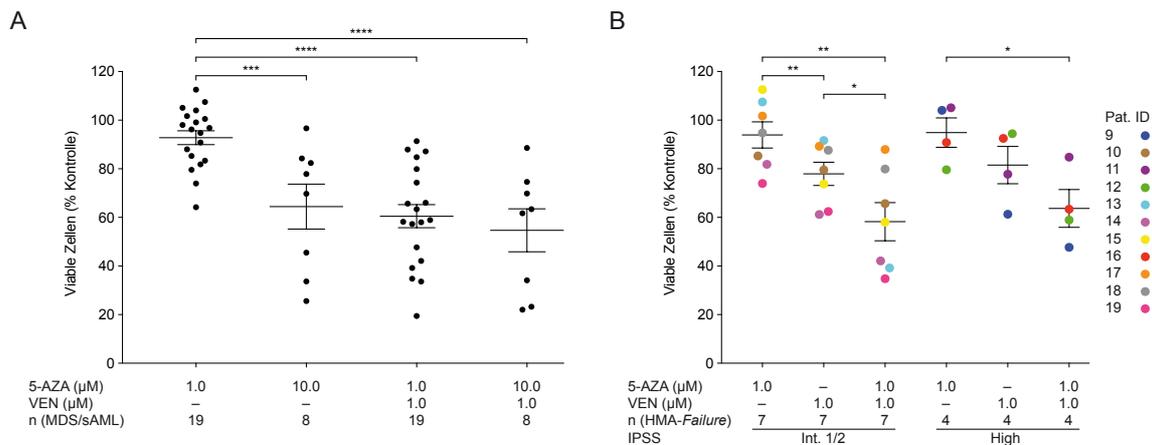


Abbildung 11: Niedrigdosis-Kombinationsbehandlung aus Venetoclax und 5-Azacytidin induziert effektiv Zelltod in der CD34⁺/CD45⁺ Stamm-/Vorläuferpopulation von MDS-/sAML-BMMNCs

BMMNCs von MDS-/sAML-Patienten wurden aus Knochenmarkpunktaten aufgereinigt und mit Venetoclax, 5-Azacytidin oder der Kombination aus beiden in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Per 7-AAD und Annexin-V Färbung im Durchflusszytometer wurde die Viabilität der CD34⁺/CD45⁺ Stamm-/Vorläuferpopulation gegen eine DMSO-Kontrolle gemessen. (A) CD34⁺/CD45⁺ BMMNCs von 19 bzw. 8 MDS-/sAML-Patienten wurden mit 5-Azacytidin 1 μM oder 10 μM einzeln oder in Kombination mit Venetoclax 1 μM für 72h behandelt. Gezeigt werden jeweils der Mittelwert der Quotienten aus Viabilität unter Venetoclax/5-Azacytidin-Behandlung und DMSO als Kontrollansatz und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM). Ergebnisse des ungepaarten, zweiseitigen *t*-Test in der Abbildung per * angezeigt (Signifikanzniveau: 0.05; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 und *****p* < 0.0001). (B) CD34⁺/CD45⁺ BMMNCs von elf MDS-/sAML-Patienten mit gesichertem HMA-Failure wurden nach IPSS-Risikoscore in „intermediate“ und „high“ Risikogruppen eingeteilt. Es folgte die Behandlung mit 5-Azacytidin 1 μM , Venetoclax 1 μM , oder der Kombination aus beiden für 72h. Werte gleicher, individueller Patienten sind jeweils farblich gleich markiert. Gezeigt werden jeweils der Mittelwert der Quotienten aus Viabilität unter Venetoclax/5-Azacytidin-Behandlung und DMSO als Kontrollansatz und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM). Ergebnisse des gepaarten, zweiseitigen *t*-Test in der Abbildung per * angezeigt (Signifikanzniveau: 0.05; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 und *****p* < 0.0001). In Teilen vorherveröffentlicht (Jilg *et al.*, 2019).

Patienten mit einem „HMA-Failure“ unter 5-Azacytidin-Behandlung, für die eine kurative Stammzelltransplantation nicht in Frage kommt, haben aufgrund mangelnder alternativer Therapieoptionen eine schlechte Prognose (Greenberg *et al.*, 2012; P. Greenberg *et al.*, 1997). In Anbetracht dessen ist es besonders bedeutsam, dass die hier untersuchte Niedrigdosis-Kombination auch in diesem Patientenkollektiv erfolgreich

Zelltod induzieren konnte (Abbildung 11B). Dabei spielte es keine Rolle, welcher IPSS-Risikogruppe die Patienten angehörten: die Kombinationsbehandlung aus 5-Azacytidin 1 μM und Venetoclax 1 μM konnte die Viabilität der $\text{CD34}^+/\text{CD45}^+$ Stamm-/Vorläuferzellen in beiden Gruppen bereits nach einmaliger 72h Behandlung erfolgreich durchschnittlich auf 58.23% (*Intermediate risk 1&2*) bzw. 63.68% (*High risk*) senken (Abbildung 11B). Spannenderweise zeigte sich in einigen Patientenproben auch unter einer Venetoclax-Einzelbehandlung gutes Ansprechen (Abbildung 11B). Zudem reagierten auch Patienten auf die Kombinationsbehandlung, die kein Ansprechen auf die jeweilige Venetoclax oder 5-Azacytidin-Einzelbehandlung aufwiesen (Abbildung 11B). Dies spricht für eine synergetische Resistenzüberwindung der Einzelstoffe im Rahmen der Kombinationsbehandlung.

5.3.4 Niedrigdosis-Kombination aus Venetoclax und 5-Azacytidin zeigt hohe Effektivität in der Verminderung der Koloniebildungsfähigkeit von MDS-/sAML-Knochenmark

Wie bereits zuvor diskutiert ist die Unterdrückung der malignen Proliferation in der klonalen Erkrankung MDS von entscheidender Bedeutung. Um zu untersuchen, wie die für das gesunde Knochenmark nicht toxische Niedrigdosis-Kombination aus 1 μM Venetoclax und 1 μM 5-Azacytidin (Vgl. Abbildung 9 & 10) im MDS-/sAML-erkranktem Knochenmark die Koloniebildungsfähigkeit modulieren kann, wurde entsprechend den gesunden Kontrollproben je 1×10^4 BMMNCs in Duplikaten ausgesät. Zuvor wurden die Zellen analog der Viabilitätsassays 72h lang mit Venetoclax und/oder 5-Azacytidin vorbehandelt. Als Kontrollansatz dienten Ansätze nach 72h 1:1000 DMSO-Behandlung. Nach 10-14 Tagen im Inkubator wurden die Platten per Lichtmikroskop ausgezählt und die Kolonien morphologisch in die Subtypen CFU-GM, BFU-E und CFU-GEMM differenziert.

Es wurde die Koloniebildungsfähigkeit von drei Hochrisiko-MDS-/sAML-Patienten nach HMA-*Failure* analysiert. Wie erwartet, führte komparabel zu den Viabilitätsassays von HMA-*Failure*-Patienten (Abbildung 11) die alleinige Vorbehandlung mit 1 μM 5-Azacytidin oder 1 μM Venetoclax nicht zu einer signifikanten Reduktion der Kolonien nach Inkubation für 14 Tage in mit Wachstumsfaktoren angereicherter Methylcellulose (Abbildung 12). Jedoch konnte in allen drei Patienten die Niedrigdosis-Kombination im Vergleich zur Kontrollbehandlung, bzw. den Einzelbehandlungen die Koloniezahl signifikant senken (Abbildung 12). Aufgrund der Tatsache, dass das mediane Überleben

von erkrankten Patienten nach HMA-Failure bei 5.6 Monaten liegt, ist dieses Erkenntnis große klinische Bedeutung zuzurechnen (Jabbour *et al.*, 2010; Prebet *et al.*, 2011). Interessanterweise zeigte sich in den drei Patienten eine besondere Sensibilität der CFU-GM Kolonien unter Kombinationsbehandlung. Dieses Ergebnis passt zu den in klinischen Studien beobachteten vermehrten Fällen von Neutropenie und Infekten unter der Kombinationsbehandlung, insbesondere in den Kohorten mit erhöhter 800 mg-Venetoclaxgabe (in Kontrast zu 400 mg Venetoclax, siehe Diskussion) (Courtney D. DiNardo *et al.*, 2018; C. D. DiNardo *et al.*, 2018).

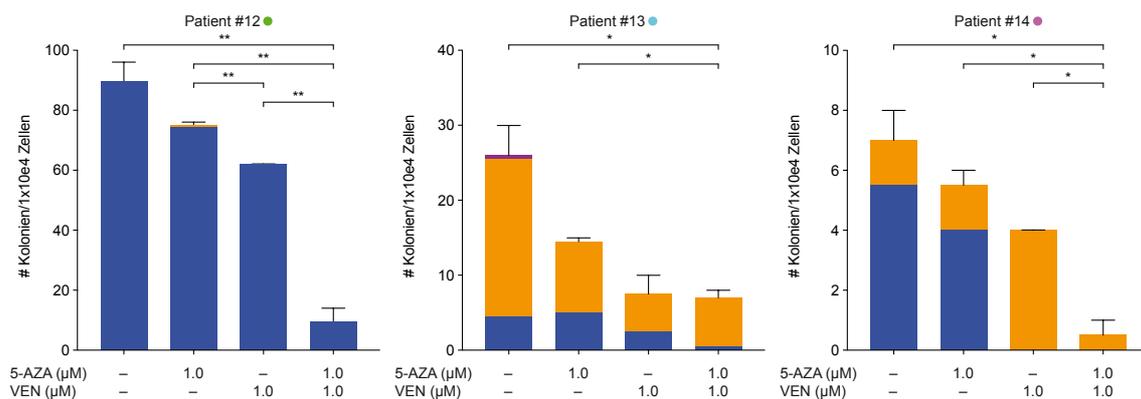


Abbildung 12: Niedrigdosis-Kombinationsbehandlung aus Venetoclax und 5-Azacytidin reduziert die Koloniebildungsfähigkeit von MDS-/sAML-BMMNCs nach HMA-Failure signifikant

BMMNCs von 3 MDS-/sAML-Patienten mit gesichertem „HMA-Failure“ wurden aus Knochenmarkpunkataten aufgereinigt und mit Venetoclax 1 µM, 5-Azacytidin 1 µM, oder der Kombination aus beiden behandelt. Nach 72h erfolgte die Waschung und Aussaat der Zellen zu 1×10^4 pro Ansatz in Duplikaten in Methylcellulose. Nach 10-14 Tagen wurden die Kolonien gezählt und in die drei Kolonietypen CFU-GM (Blau), BFU-E (Orange) und CFU-GEMM (Violett) differenziert. Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte der einzelnen Subtypen und die Standardabweichung des Mittelwerts der Gesamtkolonienzahl (SEM) unter den angegebenen Behandlungsvarianten. Ergebnisse der ungepaarten, zweiseitigen *t*-Tests in der Abbildung per * angezeigt (Signifikanzniveau: 0.05; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 und *****p* < 0.0001). In Teilen vorveröffentlicht (Jilg *et al.*, 2019).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus Venetoclax und 5-Azacytidin eine effektive Therapieoption für MDS-/sAML-Patienten darstellt (Daten und Erkenntnisse in Teilen vorveröffentlicht in: Jilg *et al.*, 2019): Insbesondere für das Patientenkollektiv, für das eine kurative Stammzelltransplantation nicht in Frage kommt, und das auf die Standardtherapie aus hypomethylierenden Substanzen kein Ansprechen bzw. Verlust von Ansprechen unter Therapie gezeigt hat („HMA-Failure“), stellt die Kombination der beiden Medikamente eine neue bzw. weitere erfolgsversprechende Therapieoption dar (Abbildung 11 & 12). Dabei ist die gezeigte enge therapeutische Breite von 5-Azacytidin zu beachten (Abbildung 9 & 10): 5-Azacytidin-Dosierungen über 1 µM hinaus erbringen keinen weiteren Nutzen für den

Patienten bei drastisch vergrößerter Toxizität auf die gesunde (Rest-) Hämatopoese. Zudem muss die observierte Sensibilität von Neutrophilen-Vorläuferkolonien gegenüber der Kombinations-behandlung in der klinischen Anwendung beachtet werden, um etwaige lebensbedrohliche Komplikation für die Patienten zu verhindern (Abbildung 12).

6 Diskussion

Deregulierte Zelltodmechanismen spielen eine zentrale Rolle in der Krankheitsentwicklung der Myelodysplastischen Syndrome und bieten zunehmend therapeutische Ansatzpunkte. Für deren detaillierte Betrachtung muss dabei zwischen den unterschiedlichen MDS-Stadien und ihren Charakteristika differenziert werden: In den frühen Stadien (MDS-SLD, MDS-MLD, MDS-RS-SLD & MDS-RS-MLD) dominiert ein hyperzelluläres Knochenmark bei niedriger Blastenzahl (<5%) mit hoher Zelltodrate und Zytopenien im peripheren Blut (Corey *et al.*, 2007; Ganan-Gomez *et al.*, 2015). Zudem ist bekannt, dass insbesondere in den frühen MDS-Stadien die Expression pro-inflammatorischer und pro-apoptotischer Zytokine wie TNF- α erhöht ist und die parakrine Inflammation den Progress der Erkrankung begünstigt (Corey *et al.*, 2007; Ganan-Gomez *et al.*, 2015). Da die insgesamt gute Prognose der Patienten mit Niedrigrisiko-MDS und geringer Mutationslast und Blastenzahl im Knochenmark eine aggressive Therapie selten rechtfertigt und eine kurative Stammzelltransplantation oft nicht in Frage kommt, liegt der Fokus bisher zumeist auf der Behandlung der klinischen Symptomatik: Fatigue, (Pan-)Zytopenien und Infektionen (Greenberg *et al.*, 2012; Hofmann W. *et al.*, 2018; S. Park & Götze, 2018). Parakrine Inflammation und früh auftretende *Driver*-Mutationen im Knochenmark früher MDS-Stadien treiben den Progress der Erkrankung und die Akquise weiterer Mutationen in Stamm- und Vorläuferzellen voran (Corey *et al.*, 2007; Jost & Hockendorf, 2019). Gleichzeitig wird angenommen, dass die erhöhte Zelltodrate im Knochenmark früher MDS-Stadien ursächlich für die peripheren Zytopenien und damit einen Großteil der klinischen Symptomatik der Patienten ist (Corey *et al.*, 2007; Hofmann W. *et al.*, 2018). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese formuliert, dass eine Inhibition der zentralen Inflammations- und Nekroptoseproteine RIPK1 und RIPK3 die gesunde Hämatopoese im Knochenmark früher MDS-Stadien unterstützen und zu einer verbesserten Zellproliferation führen kann.

Die späten MDS-Stadien MDS-EB1 & MDS-EB2 weisen hingegen eine erhöhte Blastenzahl im Knochenmark und eine zunehmende Resistenz gegenüber Zelltod-Induktion auf (Bogdanovic *et al.*, 1997; Maher Albitar *et al.*, 2002; J. E. Parker & Mufti, 1998; Jane E. Parker *et al.*, 2000; Raza *et al.*, 1997; Raza *et al.*, 1995; Shetty *et*

al., 2000). Einzig kurative Therapie ist bisher die Transplantation allogener Stammzellen (Hofmann W. *et al.*, 2018). Für Patienten, die keine Stammzelltransplantation erhalten können, stellen die hypomethylierenden Substanzen 5-Azacytidin und Decitabin den Goldstandard der Behandlung später MDS-Stadien dar (Hofmann W. *et al.*, 2018). Diese konnten in Studien einen sechs- bis neunmonatigen Überlebensvorteil gegenüber einer rein supportiven Therapie erzielen, jedoch sprechen je nach herangezogener Studie bereits initial zwischen 40-71% der Patienten nicht auf eine Behandlung mit 5-Azacytidin an (Cheson *et al.*, 2006; Müller-Thomas *et al.*, 2014; Pierre Fenaux *et al.*, 2009; Silverman *et al.*, 2002). Zudem entwickeln die Patienten über die Zeit eine zunehmende Resistenz gegenüber der Zelltodinduktion durch HMA: das mediane Ansprechen betrug in Studien 14.1 Monate (Pierre Fenaux *et al.*, 2009). Das mediane Überleben nach 5-AZA-Failure betrug in Studien 5.6 Monate (Jabbour *et al.*, 2010; Prebet *et al.*, 2011). Die zunehmende Apoptoseresistenz im Knochenmark progredienter MDS-Patienten korreliert unter anderem mit einer Zunahme anti-apoptotischer BCL-2-Proteine im Knochenmark (Boudard *et al.*, 2000; Invernizzi *et al.*, 2001). Zunehmend kommen vielversprechende selektive Proteininhibitoren wie z.B. der selektive BCL-2-Inhibitor Venetoclax zur Anwendung (Jilg *et al.*, 2016; Reidel *et al.*, 2018). Studien an AML- und MDS-Zelllinien erbrachten erste Hinweise auf synergistische Effekte und eine gute Wirksamkeit einer Kombinationstherapie aus Venetoclax und 5-Azacytidin (Bogenberger *et al.*, 2014). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Kombinationstherapie aus Venetoclax und 5-Azacytidin der allgemeinen Zelltodresistenz im späten MDS-Knochenmark sowie der selektiven Resistenz gegenüber 5-Azacytidin entgegenwirken kann und gute Wirksamkeit auf *in vitro* behandelte Knochenmarkszellen von MDS-Patienten zeigt.

6.1 Nekroptoseproteine als therapeutische Zielstruktur in der Behandlung der MDS

TNF kann über RIPK1 und auch direkt über RIPK3 Zelltod durch Nekroptose induzieren (Höckendorf *et al.*, 2016; Moujalled *et al.*, 2013). In murinen Modellen bildete eine erhöhte RIPK3-Expression im Knochenmark die Grundlage für eine erhöhte Zelltodinduktion via TNF (Moujalled *et al.*, 2013). Rein deskriptive Analysen erhöhter Zytokinlevel, insbesondere von TNF, in frühen und späten MDS-Stadien in früheren Forschungsarbeiten erhalten durch diese Arbeiten einen neuen Stellenwert (Feng *et al.*, 2011; Stifter *et al.*, 2005; Verhoef *et al.*, 1992).

Nachdem Höckendorf *et al.* 2016 anhand von *in silico* Genexpressionsprofilen bereits nachweisen konnten, dass eine Deregulation von RIPK3 und MLKL in CD34⁺ Knochenmarkszellen von MDS-Patienten (ohne sAML) auf mRNA-Ebene existiert, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch auf Protein-Ebene eine charakteristische Deregulation der RIPK3-Proteinexpression in MDS- und CMML-Patientenproben besteht (Abbildung 2 & 3). So waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollproben sowohl in der Gesamtheit der mononukleären Knochenmarkszellen als auch spezifisch in den CD34⁺ Blasten in den frühen Stadien der MDS die RIPK3-Proteinexpression signifikant erhöht (Abbildung 2). In Anbetracht der Ergebnisse von Moujalled *et al.* erscheint es möglich, dass dies einer der kontributiven Faktoren zu Nekroptose und der erhöhten Zelltodrate im Knochenmark früher MDS-Stadien ist (Moujalled *et al.*, 2013). Ebenso korreliert in der Gesamtheit der mononukleären Knochenmarkszellen wie auch spezifisch in den CD34⁺ Blasten der späten MDS-Stadien die gemessene wieder abnehmende RIPK3-Proteinexpression mit der bekannten zunehmenden Zelltdoresistenz in späten MDS-Stadien. Es bleibt zu klären, ob es sich bei der erhöhten RIPK3-Proteinexpression in frühen MDS-Stadien um eine Eigenförderung der malignen Klone oder um den Versuch der Protektion der gesunden Resthämatopoese handelt.

Interessanterweise zeigte sich zudem, dass sich das Muster der signifikanten Erhöhung der RIPK3-Proteinexpression im Frühstadium und die Abnahme auf das Niveau gesunder, alterskorrelierter BMMNCs im Spätstadium auch in der Gruppe der Chronischen Myelomonozytären Leukämien (CMML) belegen lässt (Abbildung 4). Es bleibt zu klären, ob die Expressionsunterschiede im Progress der Erkrankung Hinweise auf eine größere Verbreitung dieser Mechanismen innerhalb der Gruppe myeloischer Erkrankungen liefern oder als unspezifische Reaktion auf Inflammation im Knochenmark gewertet werden müssen. Weitere Forschung zu Regulation und Ursache dieser Expressionsunterschiede wird benötigt. Jedoch ist bereits heute denkbar, dass RIPK3 Teil der Gruppe pro-inflammatorischer Proteine sein kann, deren Expression z.B. von Craver *et al.* als Fingerabdruck einzelner hämatologischer Krebserkrankungen gewertet werden (Craver *et al.*, 2018). Deregulierte Inflammation ist dabei ein entscheidender modulierender und unter Umständen antreibender Faktor im Fortschreiten der entsprechenden Krankheiten. Zudem stellt die RIPK3-Proteinexpression so einen möglichen weiteren Verlaufsmarker der MDS-/CMML-Erkrankungen im Progress zur sAML dar.

Aufgrund der hohen Zelltodrate bzw. des Zellstress verursachenden inflammatorischen Milieus im MDS-Knochenmark und der zentralen Rolle von RIPK1 und RIPK3 im Nekroptosesignalweg, wurde ursprünglich mit einem Anstieg der Viabilität von mononukleären Knochenmarkszellen in frühen MDS-Stadien unter GSK'843A bzw. Necrostatin-1s Behandlung gerechnet: Es zeigten sich für die Behandlung mit dem RIPK3-Inhibitor GSK'843A keine Effekte auf die Viabilität gesunder wie erkrankter Zellen nach 72 Stunden Behandlung *in vitro* (Abbildung 5). Nach Vorbehandlung mit GSK'843A und Wachstum für 10-14 Tage in Methylcellulose reagierte das gesunde Kontrollknochenmark mit einer leichten, nicht signifikanten Abnahme der Gesamtkolonienzahl (Abbildung 6). Im erkrankten MDS-Knochenmark fanden sich stadienspezifische Effekte nach RIPK3-Inhibition (Abbildung 7): Während in drei Patienten mit MDS im Frühstadium der Erkrankung eine Zunahme der Kolonien im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit DMSO zu beobachten war, erfolgte eine Abnahme in zwei Patienten im Spätstadium und einem mit MDS del5q-Syndrom (Abbildung 7). Inwiefern die Zu- bzw. Abnahme an Kolonien in den einzelnen Stadien auf verbessertes Überleben der malignen Klone oder gesunden Resthämatopoese zurückgeht, bleibt zu klären. Eine nachfolgende DNA-Sequenzierung zur Analyse der Mutationslast der Kolonien nach Inhibitorbehandlung gelang im Rahmen der vorliegenden Arbeit leider nicht. Die RIPK3-Proteinlevel weisen, wie in den vorliegenden Experimenten gezeigt, im gesunden Knochenmark wie im Spätstadium MDS äquivalente Höhen auf (Abbildung 2 & 3). Im Frühstadium mit geringer Blasteninfiltration ist die gesunde Resthämatopoese quantitativ stark vertreten. Daraus darf jedoch nicht zwangsläufig der Schluss gezogen werden, dass das Knochenmark der gesunden Kontrollpersonen gleichzusetzen ist mit der gesunden Resthämatopoese in MDS-erkranktem Knochenmark. Letzteres ist durch die vorangegangene Inflammation und die Blasteninfiltration gezeichnet (Ganan-Gomez *et al.*, 2015). So können sich auch abweichende Reaktionen auf denselben Effektor zeigen. Welche Ursachen die Veränderungen der Kolonienzahl nach GSK'843A-Vorbehandlung in den zwei Patienten mit MDS/MPN-Overlaperkrankung haben, kann bei der bisher geringen Fallzahl nicht abschließend beantwortet werden.

Es zeigen sich Hinweise darauf, dass die signifikante Zunahme an Kolonien in den sechs untersuchten MDS-/sAML-Patienten nach Nec-1s-Vorbehandlung (Abbildung 8) auf eine verbesserte, langfristige Viabilität der gesunden Resthämatopoese zurückgeht, da bereits in den gesunden Kontrollproben ohne Zellstress durch Inflammation

Anzeichen eines solchen Zuwachs unter Nec-1s-Vorbehandlung zu beobachten waren (Abbildung 6). Sollte sich bestätigen, dass der Zuwachs an Kolonien nicht auf eine Verbesserung der Koloniebildungsfähigkeit der malignen Klone zurückgeht und ein akzelerierter Krankheitsprogress ausgeschlossen ist, wäre aufgrund der in den Beobachtungen ausbleibenden Knochenmarktoxizität bei verwendeter 30 μ M-Konzentration ein erster Grundstein zur experimentellen Anwendung von Nec-1s in klinischen Versuchen gelegt.

Auch der Einfluss einzelner MDS-typischer Mutationen (*ASXL1*, *RUNX1*, *TP53*, *EZH2*) auf das Ansprechen der mononukleären Knochenmarkzellen bzw. der Koloniezahl gegenüber RIPK1- und RIPK3-Inhibition wurde untersucht (Tabelle 6); in der bisher insgesamt kleinen Fallzahl von langfristig in Koloniebildungsassays untersuchten Proben waren keine eindeutigen Korrelationen erkennbar. Dennoch sind detaillierte Annotation der Patienten und die Suche nach einer Korrelation zwischen Mutationen und Therapie zukünftig unumgänglich. Grundlage einer individualisierten Medizin sind exaktere Kenntnisse über die große Anzahl MDS-korrelierter Mutationen und ihrer diversen Effekte auf das Ansprechen auf Therapien sowie die Gesamtprognose der einzelnen Patienten. Dies ermöglicht eine verbesserte Therapiefindung und -entscheidung.

Die vorliegenden Daten zeigen signifikante Veränderungen der RIPK3-Proteinexpression im Krankheitsprogress sowohl der Myelodysplastischen Syndrome als auch der MDS/MPN-Overlap Erkrankung CMML. Als Protein wirkt RIPK3 an der Schnittstelle zwischen Nekroptose und Inflammation. Es liegt nahe, dass sich RIPK3-Deregulationen signifikant auf die hohe Zelltodrate und das starke Entzündungsgeschehen in den frühen MDS-Stadien auswirken (Jost & Hockendorf, 2019). Eine Inhibition der Kinasefunktion des Proteins RIPK1 durch Nec-1s bewirkte keine Toxizität auf das gesunde Knochenmark und zeigte vielversprechende Anzeichen einer Verbesserung der Koloniebildungsfähigkeit der gesunden Resthämatopoese. Es ist davon auszugehen, dass diese Erkenntnisse das Verständnis über den Progress myelodysplastischer und myeloproliferativer Erkrankungen verbessern werden und als Grundlage zukünftiger, innovativer Therapiestrategien dienen können.

6.2 Venetoclax in Kombination mit 5-Azacytidin als gut verträgliche Behandlung therapieresistenter MDS mit enger therapeutischer Breite

Die Stammzelltherapie ist zurzeit die einzige kurative Option in der Behandlung der MDS (Hofmann W. *et al.*, 2018; Prebet *et al.*, 2011). Die Therapie mit 5-Azacytidin oder anderen HMA stellt derzeit den Goldstandard der Behandlung von MDS-Erkrankten dar, für die eine Stammzelltransplantation nicht in Frage kommt, bzw. die HMA als Übergangstherapie zur Vorbereitung auf eine Stammzelltransplantation erhalten (Hofmann W. *et al.*, 2018; Prebet *et al.*, 2011). Insbesondere Patienten, die auf diese Behandlung nicht oder nur eingeschränkt ansprechen, haben eine sehr schlechte Prognose (Prebet *et al.*, 2011). 40-71% der Patienten zeigen bereits initial kein Ansprechen auf eine 5-Azacytidin-Behandlung und das mediane Ansprechen unter 5-Azacytidin beträgt in Studien 14.1 Monate (Cheson *et al.*, 2006; Kotsianidis *et al.*, 2019; Müller-Thomas *et al.*, 2014; Pierre Fenaux *et al.*, 2009; Silverman *et al.*, 2002). Das mediane Überleben nach 5-Azacytidin-Failure beträgt 5.6 Monate (Prebet *et al.*, 2011). Diverse neue Therapieoptionen werden derzeit getestet (Bewersdorf, Carraway, & Prebet, 2020). Die Wirksamkeit einer Venetoclax-Monotherapie auf Stamm-/Vorläuferzellen von MDS-Erkrankten konnte *in vitro* bereits gezeigt werden (Jilg *et al.*, 2016; Reidel *et al.*, 2018). Die nachfolgend diskutierten Daten und Erkenntnisse wurden in Teilen vorveröffentlicht in *Experimental Hematology & Oncology* (Jilg *et al.*, 2019):

Die vorliegenden *in vitro* Daten gesunder Kontrollproben zeigen in der Gesamtheit der mononukleären Knochenmarkszellen eine signifikante Toxizität der Kombinationstherapie aus 5-Azacytidin und Venetoclax gegenüber einer 5-Azacytidin-Monotherapie bereits ab 5-Azacytidin-Dosierungen $\geq 5 \mu\text{M}$ (Abnahme um 44.8% bis 59.5%) (Abbildung 9A). Noch stärker ist dieser Effekt in den CD34⁺/CD45⁺ Stamm-/Progenitorzellen zu beobachten (Abnahme um 86.4% bis 90.1%) (Abbildung 9B). Dabei scheint auch eine 5-Azacytidin Monotherapie in Dosierungen über 1 μM deutliche Toxizität auf die gesunden CD34⁺/CD45⁺ Stamm-/Progenitorzellen zu besitzen (Abbildung 9B). Bedeutsam ist, dass sich die toxische Wirkung auf die gesunde Hämatopoese nicht nur im kurzzeitigen Überleben der Zellen nach 72h-Behandlung zeigt, sondern insbesondere auch in der längerfristigen Fähigkeit zur Koloniebildung der Zellen in Methylcellulose unter Zugabe von Wachstumsfaktoren: 5-Azacytidin in Monotherapie und mehr noch in Kombination mit 1 μM Venetoclax

brachten die Koloniebildungsfähigkeit bereits ab Dosen $>1 \mu\text{M}$ 5-Azacytidin nahezu vollständig zum Erliegen (Abnahme um 77.6% bis 99.4%) (Abbildung 10). Zusammenfassend zeigt sich, dass die Kombination aus $1 \mu\text{M}$ 5-Azacytidin und $1 \mu\text{M}$ Venetoclax sowohl kurzfristig nach 72h als auch längerfristig in Hinsicht auf die Koloniebildungsfähigkeit der gesunden Stamm-/Progenitorzellen eine tolerable Dosierung darstellt. Hingegen zeigen höhere 5-Azacytidin Dosierungen insbesondere in Kombination mit Venetoclax ein ungünstiges Toxizitätsprofil in Bezug auf die gesunde Hämatopoese. Damit ergeben sich für einen Einsatz im Menschen enge Grenzen der Anwendung und Evaluation der 5-Azacytidin plus Venetoclax-Kombinationstherapie. Der Erhalt einer suffizienten Resthämatopoese trotz zytotoxischer Behandlung der malignen Klone ist angesichts der typischen krankheitsbedingten Komplikationen der Erkrankung (Fatigue, Anämie, Panzytopenie und insbesondere Immunschwäche) von entscheidender Bedeutung (Hofmann W. *et al.*, 2018).

Die vorliegenden Daten zeigen *in vitro* eine geringe Wirksamkeit einer einmaligen 72h Behandlung von MDS-Knochenmarkzellen mit $1 \mu\text{M}$ 5-Azacytidin (Abbildung 11). Ebenso konnte diese geringe Dosis in drei Hochrisiko-/sAML-Patienten keine ausreichende Toxizität auf die Koloniebildungsfähigkeit der Knochenmarkzellen nach 10-14 Tagen bewirken (Abbildung 12). Vergleichbar zu Jilg *et al.* und Dill *et al.* konnte eine Monotherapie mit $1 \mu\text{M}$ Venetoclax im Kollektiv der Patienten nach HMA-Failure sowohl nach 72h *in vitro* Behandlung als auch in den Koloniebildungsassays nach 10-14 Tagen bereits moderate toxische Wirkung entfalten (Abbildung 11 & 12) (Jilg *et al.*, 2016; Reidel *et al.*, 2018). Die Kombination aus $1 \mu\text{M}$ Venetoclax und $1 \mu\text{M}$ 5-Azacytidin zeigte jedoch konstant signifikante Toxizität auf die kurzfristige Viabilität der malignen MDS-Zellen von HMA-Failure-Patienten nach 72h Behandlung (58.23% (*Intermediate risk* 1&2) bzw. 63.68% (*High risk*) (Abbildung 11B)) und die längerfristige Koloniebildungsfähigkeit nach 10-14 Tagen in Methylcellulose unter Zusatz von Wachstumsfaktoren (Abbildung 11 & 12). Interessanterweise führte eine Dosiserhöhung von 5-Azacytidin auf $10 \mu\text{M}$ in Kombination mit $1 \mu\text{M}$ Venetoclax in 19 MDS-Proben nicht zu einer signifikant vermehrten Wirksamkeit auf die Knochenmarkzellen im Vergleich zur Kombination aus $1 \mu\text{M}$ 5-Azacytidin und $1 \mu\text{M}$ Venetoclax (Abnahme um 43.3% vs. 39.5%) (Abbildung 11). Daraus lässt sich ableiten, dass eine Dosiserhöhung über $1 \mu\text{M}$ 5-Azacytidin insbesondere in Kombination mit Venetoclax $1 \mu\text{M}$ die Wirkung auf das erkrankte Knochenmark nicht steigern kann, gleichzeitig aber massiv erhöhte toxische Wirkung auf das kurz- und längerfristige

Überleben der gesunden Resthämatopoese aufweist (Abbildungen 9 & 10). Interessant ist die signifikante Überlegenheit hinsichtlich Zelltodinduktion und Unterdrückung der Koloniebildungsfähigkeit der Kombinationstherapie aus 1 μ M 5-Azacytidin und 1 μ M Venetoclax im Vergleich zu der jeweiligen Monotherapie im Kollektiv der 5-Azacytidin-*Failure*-Patienten (Abbildung 11B & 12). In der klinischen Betrachtung haben diese Patienten eine extrem schlechte Prognose, sofern eine Stammzelltransplantation nicht in Frage kommt (Jabbour *et al.*, 2010; Prebet *et al.*, 2011). Die progrediente Dysbalance von anti-apoptotischen Proteinen gegenüber den pro-apoptotischen Proteinen spielt eine wichtige Rolle in der zunehmenden Apoptoseresistenz von fortgeschritten MDS-erkrankten Knochenmarkern (Invernizzi *et al.*, 2001; Raza & Galili, 2012). Der Einsatz des selektiven BCL-2-Inhibitors Venetoclax in tolerabler Dosis kann bereits als Monotherapie in MDS-Stamm- und -Vorläuferzellen Zelltod induzieren (Jilg *et al.*, 2016; Reidel *et al.*, 2018). Zudem konnte in *in vitro*-Versuchen mit AML-Zelllinien und einer MDS-Zelllinie (MDS-L) nachgewiesen werden, dass Venetoclax die Zellen gegenüber 5-Azacytidin sensitiviert und synergistisch wirkt (Bogenberger *et al.*, 2014). Auch wenn die genauen Mechanismen der Resistenz gegenüber 5-Azacytidin in MDS heute noch nicht vollständig verstanden sind, ist aus den zitierten Arbeiten und den hier präsentierten Daten abzulesen, dass die (teilweise) Wiederherstellung der Apoptosefähigkeit von MDS-Stamm- und -Vorläuferzellen durch Venetoclax einen wichtigen Schritt zur suffizienten Zelltodinduktion durch 5-Azacytidin im Rahmen der Kombinationsbehandlung darstellt (Abbildung 11B). Interessanterweise zeigten sich die Effekte einer Venetoclax-Monotherapie in MDS unabhängig von klassischen, ungünstigen Mutationen in den Stamm-/Vorläuferzellen der untersuchten Patienten (Reidel *et al.*, 2018). Auch in den vorliegenden Daten konnte keine Korrelation zwischen Ansprechen der Zellen auf die verschiedenen Therapieregime und einer vorbestehenden Mutationslast gefunden werden (Tabelle 7). Dies spricht für einen universelleren Mechanismus der Apoptose-/5-Azacytidin-Resistenz und erhöht die Wahrscheinlichkeit auf breites Ansprechen auf die Kombinationstherapie aus Venetoclax und 5-Azacytidin in der heterogenen Gruppe der MDS-Erkrankten. Denkbar wäre zudem – bei tolerablem Nebenwirkungsprofil – der Einsatz einer Kombinationsbehandlung nicht nur nach 5-Azacytidin-*Failure* oder in den Hochrisikostadien, sondern ebenfalls in Patienten mit mittlerem Risiko einer sAML-Transformation und ohne Möglichkeit einer Stammzelltransplantation. Weitere Studien,

insbesondere Langzeitverläufe entsprechend behandelter Patienten, sind für eine qualifizierte Aussage unabdingbar.

Die vorliegenden Daten unterstützen eine Kombination von 5-Azacytidin und dem selektiven BCL-2-Inhibitor Venetoclax im Kollektiv der 5-Azacytidin-*Failure*-Patienten. Unter anderen DiNardo *et al.* konnten in mehreren Publikationen zeigen, dass auch in der klinischen Testung dieser Kombinationstherapie eine signifikante Wirkung und Prognoseverbesserung in der Behandlung von Patienten mit AML und anderen myeloiden Erkrankungen erreicht werden konnte (Courtney D. DiNardo *et al.*, 2018; DiNardo *et al.*, 2019; C. D. DiNardo *et al.*, 2018). In den genannten Studien zeigten sich hohe Komplikationsraten unter Venetoclax in Kombination mit 5-Azacytidin und Decitabine: Von 43 Patienten mit AML-Diagnose, MDS-Diagnose und der Diagnose einer Blastischen plasmazytoiden dendritischen Zellneoplasie (BPDCN), die eine Venetoclax plus HMA-Kombinationsbehandlung erhielten, zeigten unter Therapie 100% eine schwerwiegende Neutropenie (Grad 3 nach der Einteilung der National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events) und 72% eine schwerwiegende (Grad ≥ 3) Infektion, zumeist Pneumonien (C. D. DiNardo *et al.*, 2018). Bei 15 von 22 (68.2%) AML-Patienten einer Phase 1b Studie zu Venetoclax plus 5-Azacytidin-Kombinationsbehandlung ergaben sich höhergradige Komplikationen (Grad ≥ 3), darunter einmalig eine letal verlaufende Sepsis (Courtney D. DiNardo *et al.*, 2018). Eine 2019 veröffentlichte Studie zu Venetoclax in Kombination mit 5-Azacytidin in AML-Patienten wies bei standardisierter subkutaner 5-Azacytidin-Gabe von 75 mg/m²/d und variierender Venetoclaxgabe von 400 mg, 800mg oder 1200 mg schwerwiegende Komplikationen (Grad ≥ 3) in allen drei Therapiearmen auf (DiNardo *et al.*, 2019): 25 von 29 Patienten (86%) aus dem „400 mg Venetoclax“-Studienarm zeigten Komplikationen Grad ≥ 3 , darunter 11 (38%) neutropenes Fieber. Im „800 mg Venetoclax“-Studienarm zeigten 30 von 37 Patienten (81%) Komplikationen Grad ≥ 3 , darunter 13 (35%) neutropenes Fieber. Im „1200 mg Venetoclax“-Studienarm erlitten fünf von sechs Patienten (83%) Komplikationen Grad ≥ 3 , darunter drei (50%) neutropenes Fieber. Ebenso berichteten Wei *et al.* beim ASH-Kongress 2017 und beim EHA 2018 von unerwünschten Nebenwirkungen einer vergleichbaren Kombinationsbehandlung (A. Wei *et al.*, 2017; A. H. Wei *et al.*, 2018). In einer parallel zu diesem Projekt laufende klinische Studie zur Untersuchung von 5-Azacytidin plus Venetoclax an MDS-Hochrisikopatienten (Abbvie M15-531) präsentierten sich ebenfalls erhöhte Raten toxischer Nebenwirkungen, sodass die tägliche Venetoclaxgabe

in allen Therapiearmen von 800 mg auf 400 mg reduziert werden musste. Garcia *et al.* präsentierten auf dem ASH-Kongress 2020 Ergebnisse der Phase 1b Studie „Venetoclax plus 5-Azacytidin“ in bisher unbehandelten Hochrisiko-MDS (NCT02942290) (Garcia *et al.*, 2020): auch hier zeigten sich insgesamt erhöhte Komplikationsraten (97% der Patienten litten unter Komplikationen ≥ 3 Grad) und speziell in den Kohorten mit Venetoclaxgaben über der Dosierung von 400 mg, sodass die Dosierungen auf 100 mg, 200 mg und 400 mg Venetoclax reduziert wurden (Garcia *et al.*, 2020). Erfreulicherweise zeigte sich ein insgesamt hohes Ansprechen von 77% (42% CR plus 35% medulläre CR) in den untersuchten Kohorten (Garcia *et al.*, 2020). Zeidan *et al.* präsentierten auf dem EHA25 Kongress 2020 aktualisierte Daten der auf dem ASH-Kongress 2019 von Wei *et al.* präsentierten Studie (NCT02966782) (Zeidan *et al.*, 2020): darin konnte die Kombination aus 100 mg, 200 mg oder 400 mg Venetoclax in Kombination mit 75 mg/m²/d 5-Azacytidin bei 40% der 37 Patienten mit therapierefraktären MDS oder MDS-Rezidiv eine komplette Remission erzielen (CR) (Zeidan *et al.*, 2020). Medianes progressfreies Überleben dauerte 9.1 Monate an (Zeidan *et al.*, 2020). Interessanterweise zeigen die Daten aus DiNardo *et al.* bei gleichbleibender Dosierung von 5-Azacytidin 75 mg/m²/d und variierender Einzeldosierung von Venetoclax zwischen 400 mg und 1200 mg keine signifikante Verbesserung der Behandlungsergebnisse hinsichtlich Gesamtüberleben, Erreichen von kompletter oder partieller Remission und dem Andauern dieser Effekte zwischen den Behandlungsarmen in Patienten mit AML (DiNardo *et al.*, 2019). Dabei korrelierte in Studien eine tägliche Gabe von 400 mg Venetoclax (in Kombination mit 5-Azacytidin 75 mg/m²/d) mit einer gemessenen maximalen Serumkonzentration (C_{\max}) von 1.15 μM und eine Gabe von 800 mg Venetoclax im gleichen Aufbau mit einer C_{\max} von 3.54 μM (Courtney D. DiNardo *et al.*, 2018). Ähnliche Ergebnisse erbrachten Messungen, denen das U.S. Food and Drug Administration (FDA) Datenblatt zu Venetoclax zugrunde liegt: hier betrug die C_{\max} nach täglicher Gabe von 400 mg Venetoclax $2.42 \pm 1.27 \mu\text{M}$ (U.S. Food and Drug Administration, 2018). Entsprechend gibt die FDA die C_{\max} von 5-Azacytidin nach einwöchiger *Subcutangabe* von 5-Azacytidin 75 mg/m²/d mit $3.07 \pm 1.65 \mu\text{M}$ an (U.S. Food and Drug Administration, 2008). Die hier verwendeten *in vitro*-Dosierungen von 1 μM Venetoclax und 1-10 μM 5-Azacytidin bilden demnach eine gute Annäherung an die klinischen C_{\max} -Messungen nach üblicher Gabe der Dosen von 5-Azacytidin 75 mg/m²/d und 400 mg Venetoclax ab. In Anbetracht der gezeigten Auswirkungen von 5-Azacytidin-Dosierungen jenseits von 1 μM auf die gesunde

Hämatopoese (sowohl kurz- als auch längerfristig) – bei fehlender Wirkungsverstärkung höherer Dosierungen auf die malignen Zellen – und den in den vorliegenden Daten und in klinischen Studien beobachteten toxischen – teils letalen – Auswirkungen hoher Venetoclax-Dosierungen sollten die Dosierungen von 5-Azacytidin und Venetoclax insbesondere in Kombinationsbehandlungen streng evaluiert und limitiert werden. Denkbar sind regelmäßige Spitzenspiegelkontrollen der Serumkonzentrationen in der klinischen Anwendung und gegebenenfalls eine konsequente Anpassung der verabreichten Dosierungen. Zugleich darf der minimal zu erreichende klinische Effekt der Therapie nicht aufgrund von Nebenwirkungen signifikant unterschritten werden. Es sind weitere Studien notwendig zur besseren Dosisfindung. Jilg *et al.* beschrieben bereits 2016 die Korrelation zwischen dem Ansprechen von MDS-erkrankten Knochenmarkzellen auf Venetoclax und der nativ gemessenen Zusammensetzung pro- und anti-apoptotischer BCL-2-Proteine (Jilg *et al.*, 2016). Dabei zeigte sich, dass ein hoher Quotient aus BCL2 und MCL-1 + BCL-X_L vor Gabe von Venetoclax einen positiv-prädikativen Wert hinsichtlich des Ansprechens auf die Therapie darstellt (Jilg *et al.*, 2016). Vergleichbare Messungen für eine Kombinationsbehandlung aus 5-Azacytidin und Venetoclax können in Zukunft eine passgenauere Dosierung für den einzelnen Patienten ermöglichen und unerwünschte Nebenwirkungen verhindern.

Zusammengefasst bietet die Modulation der Nekroptose- und Inflammationssignalkaskaden im MDS-Frühstadium vielversprechende Hinweise auf zukünftige Therapieoptionen, weitere Forschung zum Verständnis der Prozesse und der klinischen Anwendung vorausgesetzt. Die Kombination der etablierten 5-Azacytidin-Behandlung mit dem selektiven BCL-2-Inhibitor Venetoclax kann eine gut verträgliche und wirksame Therapieoption für MDS-Erkrankte darstellen, für die eine kurative Stammzelltransplantation nicht in Frage kommt. Dabei gilt es jedoch, die geringe therapeutische Breite von Venetoclax in Kombination mit 5-Azacytidin in der gesunden Resthämatopoese zu beachten, um fatale Verläufe aufgrund von Neutropenien und gestörter gesunder Resthämatopoese zu verhindern.

7 Zusammenfassung

Regulierte Zelltodmechanismen spielen eine wichtige Rolle in Pathogenese und Progress der Myelodysplastischen Syndrome. Sowohl inflammatorische (Nekroptose) als auch nicht-inflammatorische Prozesse (Apoptose) scheinen relevant zu sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die Deskription pro-inflammatorischer Vorgänge, die Auswirkungen der Modulation von Entzündungsprozessen auf die gesunde Resthämatopoese und das therapeutische Potential pro-apoptotischer Interventionen gelegt.

Die vorliegende Dissertation zeigt eine stadienkorrelierte Proteinexpression des Inflammations- und Nekroptoseproteins RIPK3 in primären Knochenmarkproben von Patienten mit MDS und CMML. Es ergaben sich erste Hinweise auf eine Verbesserung der gesunden Resthämatopoese unter Nec-1s-Behandlung in *in vitro* behandelten Knochenmarkzellen MDS-erkrankter Patienten. Diese war in der untersuchten Kohorte unabhängig von Krankheitsstadien. Für die Kohorte der Hochrisiko-MDS-Patienten bietet die Kombination aus Venetoclax und 5-Azacytidin eine vielversprechende innovative Behandlungsoption. Insbesondere kann die Wiederherstellung der Apoptosefähigkeit zuvor 5-Azacytidin-resistenter/refraktärer Knochenmarkzellen und konsequentes Ansprechen auf die Kombinationsbehandlung dem Kollektiv der 5-Azacytidin-*Failure*-Patienten mit infauster Prognose neue Therapieoptionen geben. Vergleichbare Ansätze werden bzw. wurden erfolgreich auch in anderen Krankheitsentitäten untersucht, so z.B. in der *de novo* AML. Die vorliegenden *in vitro*-Ergebnisse stärken den Ansatz einer niedrig dosierten Kombinationstherapie in MDS. Dabei zeigen sich in den Studien ebenso wie in den hier vorliegenden Daten Hinweise auf erhöhte Toxizität gegenüber der gesunden Resthämatopoese der Patienten bei Verwendung von 5-Azacytidin in Dosierung $\geq 5 \mu\text{M}$ und in Kombination mit Venetoclax $\geq 1 \mu\text{M}$. Diese kann schlimmstenfalls letal verlaufen und bedingt eine zu diskutierende Dosisreduktion auf tolerable Dosen $< 5 \mu\text{M}$ 5-Azacytidin und $1 \mu\text{M}$ Venetoclax bzw. eine detaillierte klinische Überwachung der Therapie. Im Rahmen einer individuellen Therapieentscheidung sollten prädikative Parameter dieser Therapie untersucht werden: Die Bestimmung der BCL-2-Protienexpression in MDS-BMMNCs vor Therapiebeginn mit Venetoclax wäre eine sinnvolle diagnostische Ergänzung. Teile

dieser Dissertation wurden in *Experimental Hematology & Oncology* veröffentlicht (Jilg *et al.*, 2019).

8 Anhang

#	Alter	Geschlecht	WHO	Karyotyp	Zytogenetik (Schanz et al.)	Schwere Anämie	IPSS	IPSS-r	ASXL1 Mutation	RUNX1 Mutation	TP53 Mutation	EZH2 Mutation	Andere Mutationen	Therapie
1	78	männlich	MDS-RS-SLD	47, XY +8	intermediär	positiv	intermediate-1	intermediate	X	X	X	X	X	keine
2	74	weiblich	MDS-RS-MLD	46, XX	gut	positiv	intermediate-1	intermediate	X	X	X	X	X	keine
3	75	weiblich	MDS-MLD	46, XX, del(5)(q13q34)(15); 46, XX (5)	gut	positiv	low	low	negativ	negativ	negativ	negativ	TET2	keine
4	74	weiblich	MDS-MLD	46, XX	gut	absent	low	very low	negativ	negativ	negativ	negativ	X	keine
5	82	männlich	MDS-MLD	46, XY	gut	positiv	intermediate-1	low	positiv	negativ	negativ	positiv	X	keine
6	86	weiblich	MDS-MLD	46, XX, del(5)(q13q34)(15); 46, XX	gut	negativ	low	intermediate	positiv	negativ	negativ	negativ	X	keine
7	74	männlich	MDS-MLD	46, XY	gut	negativ	intermediate-1	low	negativ	negativ	negativ	negativ	ZRSR2, TET2	keine
8	74	männlich	MDS-MLD	46, XY	gut	positiv	intermediate-1	intermediate	negativ	negativ	negativ	X	KMT2A, DNMT3A, IDH2, BCOR	keine
9	61	männlich	MDS-MLD	46, XY	gut	positiv	low	low	negativ	negativ	negativ	negativ	SF3B1	keine
10	71	weiblich	MDS-MLD	46, XX	gut	negativ	low	low	negativ	negativ	negativ	negativ	X	keine
11	74	männlich	MDS-MLD	46, XY	gut	negativ	intermediate-1	low	positiv	negativ	positiv	negativ	CSF3R, SETBP1	HMA
12	70	männlich	MDS del5q	46, XY del5q	gut	positiv	intermediate-1	low	positiv	negativ	negativ	positiv	CBL	keine
13	86	weiblich	MDS del5q	46 XX del5q, 46 XX del11q, 46 XX	gut	negativ	low	low	X	X	negativ	X	X	keine
14	64	weiblich	MDS EB 1	47, XX,+8	intermediär	negativ	intermediate-2	intermediate	positiv	positiv	X	positiv	X	keine
15	66	männlich	MDS EB 1	46, XY	gut	negativ	intermediate-1	intermediate	positiv	X	X	X	X	keine
16	58	weiblich	MDS EB 1	46, XX, t3	schlecht	positiv	intermediate-2	high	positiv	negativ	negativ	negativ	X	HMA
17	68	männlich	MDS EB 1	46, XY	gut	positiv	intermediate-1	high	positiv	positiv	X	X	X	HMA
18	74	weiblich	MDS EB 1	46, XX	gut	negativ	intermediate-1	intermediate	X	X	negativ	negativ	X	keine
19	60	männlich	MDS EB 2	46, XY, EVI1-Rearrangement: [t(3;3), inv(3)]	schlecht	negativ	intermediate-2	very high	positiv	X	X	X	X	keine
20	69	männlich	MDS EB 2	46, XY	gut	negativ	intermediate-1	intermediate	positiv	negativ	negativ	negativ	JAK2+	keine
21	69	weiblich	MDS EB 2	46, XX	gut	positiv	intermediate-2	very high	positiv	negativ	X	negativ	X	keine
22	75	männlich	MDS EB 2	45, X, -Y (3); 45, X, -Y, del(11)(q14q25) (9); 46, XY (9)	intermediär	negativ	high	high	negativ	negativ	negativ	negativ	SF3B1	keine
23	71	männlich	MDS EB 2	46, XY	gut	positiv	intermediate-1	high	positiv	positiv	X	X	X	HMA
24	75	männlich	MDS EB 2	46, XY	gut	positiv	intermediate-1	high	positiv	positiv	X	X	X	HMA
25	70	männlich	sAML	46, XY	gut	positiv	sAML	sAML	negativ	negativ	negativ	negativ	SRSF2	HMA
26	66	männlich	sAML	46, XY, del(7)(q21q36); del(20)(q11q13)	schlecht	negativ	sAML	sAML	negativ	negativ	negativ	X	BCOR, UZAF1	keine
27	62	männlich	sAML	46, XY, inv(11), +14, +8, 46, XX, del(5q), del(16q)	schlecht	negativ	sAML	sAML	negativ	negativ	negativ	negativ	X	keine
28	58	weiblich	sAML	46, XX, del(5q), del(16q)	gut	negativ	sAML	sAML	X	X	X	X	X	HMA
29	65	männlich	sAML	46, XY	gut	positiv	sAML	sAML	positiv	negativ	negativ	negativ	SRSF2, JAK2	Hydroxyurea
30	82	weiblich	sAML	46, XX	gut	negativ	sAML	sAML	negativ	X	X	X	X	keine
31	67	männlich	MDS/MPN Overlap	46, XY	gut	positiv	X	X	positiv	negativ	negativ	negativ	SRSF2, TET2	HMA
32	54	männlich	CMML-1	47, XY, +8	intermediär	positiv	X	X	positiv	Negativ	Negativ	Negativ	NRAS, SRSF2, TET2	keine
33	75	weiblich	CMML-1	46, XX (95%); [t: del(4)(TET2)]	gut	negativ	X	X	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	SRSF2, TET2	keine
34	72	männlich	CMML-1	46, XY	gut	negativ	X	X	X	X	Negativ	Negativ	CBL, KRAS, UZAF1	keine
35	68	männlich	CMML-1	46, XY	gut	negativ	X	X	negativ	negativ	negativ	X	SRSF2, TET2	keine
36	75	weiblich	CMML-1	46, XX (95%); [t: del(4)(TET2)]	gut	negativ	X	X	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	SRSF2, TET2	keine
37	52	männlich	CMML-2	46, XY	gut	negativ	X	X	Positiv	Negativ	Negativ	X	CBL, KRAS, UZAF1	keine
38	75	männlich	CMML-2	46, XY	gut	negativ	X	X	X	X	X	X	NRAS, TET2	keine
39	57	männlich	CMML-2	46, XY	gut	negativ	X	X	Positiv	X	Negativ	X	SRSF2, TET2	HMA
40	76	männlich	CMML-2	46, XY	gut	negativ	X	X	X	X	X	X	TET2	keine
41	82	weiblich	CMML-2	46, XX	gut	negativ	X	X	Negativ	X	X	X	X	keine

Tabelle 6: Klinische Annotierung der analysierten Patienten in Versuchen zu RIPK1 & RIPK3
 Alter, Geschlecht, Diagnose (WHO), Karyotyp, Zytogenetischer Risikoscore (nach (Schanz et al., 2012)), schwere Anämie (<9g/dl in Männern, <8g/dl in Frauen), IPSS, IPSS-r, Mutationen und relevante Vorbehandlung wurden in 41 analysierten Patienten klinisch annotiert.

Patienten ID	Alter	Geschlecht	WHO	Karyotyp	Zytogenetik (Schanz et al.)	Schwere Anämie	IPSS	IPSS-r	A5XL1 Mutation	RUNX1 Mutation	TP53 Mutation	EZH2 Mutation	Therapie bisher	IWG Ansprechen (Cheson et al.)
1	84	männlich	sAML	46, XY	gut	negativ	sAML	sAML	negativ	X	negativ	X	keine	X
2	66	männlich	MDS EB 1	46, XY	gut	positiv	intermediate 1	high	positiv	X	X	X	EPO	X
3	74	männlich	MDS-MLD	46, XY	gut	positiv	intermediate 1	intermediate	no mut	negativ	negativ	X	keine	X
4	75	männlich	MDS-MLD (aus MDS EB 2)	46, XY	gut	positiv	complete remission	complete remission	positiv	negativ	negativ	negativ	HMA	Complete Remission
5	68	männlich	MDS-MLD (aus sAML)	46, XY	gut	positiv	intermediate 1	low	X	X	X	X	HMA	Marrow CR
6	85	männlich	sAML	46, XY	gut	negativ	sAML	sAML	negativ	negativ	negativ	negativ	HMA	Stable disease
7	76	weiblich	sAML	46, XX	gut	negativ	sAML	sAML	X	X	X	X	HMA	Stable disease
8	76	männlich	sAML	46, XY	gut	positiv	sAML	sAML	negativ	negativ	negativ	negativ	HMA	Stable disease
9	71	männlich	sAML	46, XY,+1,der(1;22)(q10;q10)	intermediär	negativ	sAML	sAML	mut	negativ	negativ	negativ	HMA	Failure
10	80	männlich	MDS EB 1	46, XY	gut	negativ	intermediate 1	high	X	X	X	X	HMA	Failure
11	70	männlich	sAML	46, XY	gut	positiv	sAML	sAML	negativ	negativ	negativ	negativ	HMA	Failure
12	58	weiblich	sAML	46,XX,del(5q),del(16q)	gut	negativ	sAML	sAML	X	X	X	X	HMA	Failure
13	57	männlich	MDS EB 2	46, XY	gut	negativ	intermediate 2	high	negativ	negativ	negativ	negativ	HMA	Failure
14	71	männlich	MDS EB 1	46, XY; 45, XY, -7	schlecht	negativ	intermediate 2	very high	X	X	X	X	HMA	Failure
15	75	männlich	MDS EB 2	46, XY	gut	positiv	intermediate 1	high	positiv	positiv	X	X	HMA	Failure
16	66	weiblich	sAML	46,XX,del(5)(q22;q37),der(18)(14;18)(q22;q27)[9]/46,XY[1]	gut	positiv	sAML	sAML	X	X	X	X	HMA	Failure
17	80	männlich	MDS EB 2	47, XY del5q, r6, +8, del13q, der16;46, XY	sehr schlecht	positiv	intermediate 2	very high	negativ	negativ	positiv	negativ	HMA	Failure
18	68	männlich	MDS EB 1	46, XY	gut	positiv	intermediate 1	high	positiv	positiv	X	X	HMA	Failure
19	68	männlich	MDS EB 1	46, XY	gut	positiv	intermediate 1	high	positiv	positiv	X	X	HMA	Failure
20	74	weiblich	sAML	Komplex (>3 Aberrations)	sehr schlecht	negativ	sAML	sAML	negativ	negativ	positiv	negativ	HMA	Failure
21	73	weiblich	MDS EB 2	Komplex (>3 Aberrations)	sehr schlecht	negativ	intermediate 2	very high	X	X	positiv	X	HMA	Failure

Tabelle 7: Klinische Annotierung der analysierten Patienten in Versuchen zu Venetoclax und 5-Azacytidin

Patienten-ID, Alter, Geschlecht, Diagnose (WHO), Karyotyp, Zytogenetischer Risikoscore (nach (Schanz et al., 2012)), schwere Anämie (<9g/dl in Männern, <8g/dl in Frauen), IPSS, IPSS-r, Mutationen, relevante Vorbehandlung und etwaiges Ansprechen wurden in 21 analysierten Patienten klinisch annotiert.

9 Literaturverzeichnis

- Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, *26*(9), 1324-1337.
- Anderson, L. A., Pfeiffer, R. M., Landgren, O., Gadalla, S., Berndt, S. I., & Engels, E. A. (2009). Risks of myeloid malignancies in patients with autoimmune conditions. *Br J Cancer*, *100*(5), 822-828.
- Anderson, M. A., Deng, J., Seymour, J. F., Tam, C., Kim, S. Y., Fein, J., Yu, L., Brown, J. R., Westerman, D., Si, E. G., Majewski, I. J., Segal, D., Heitner Enschede, S. L., Huang, D. C., Davids, M. S., Letai, A., & Roberts, A. W. (2016). The BCL2 selective inhibitor venetoclax induces rapid onset apoptosis of CLL cells in patients via a TP53-independent mechanism. *Blood*, *127*(25), 3215-3224.
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M., & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, *127*(20), 2391-2405.
- Aul, C., Giagounidis, A., & Germing, U. (2001). Epidemiological Features of Myelodysplastic Syndromes: Results From Regional Cancer Surveys and Hospital-Based Statistics. *International Journal of Hematology*, *73*, 405-410.
- Bewersdorf, J. P., Carraway, H., & Prebet, T. (2020). Emerging treatment options for patients with high-risk myelodysplastic syndrome. *Ther Adv Hematol*, *11*, 1-22.
- Bincoletto, C., Saad, S., da Silva, E., & Queiroz, M. (1999). Haematopoietic response and bcl-2 expression in patients with acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol*, *62*, 38-42.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Develoöment*, *16*, 6-21.
- Bogdanovic, A., Trpinac, D., Jankovic, G., Bumbasirevic, V., Obradovic, M., & Colovic, M. (1997). Incidence and role of apoptosis in myelodysplastic syndrome: morphological and ultrastructural assessment. *Leukemia*, *11*, 656-659.
- Bogenberger, J. M., Kornblau, S. M., Pierceall, W. E., Lena, R., Chow, D., Shi, C. X., Mantei, J., Ahmann, G., Gonzales, I. M., Choudhary, A., Valdez, R., Camoriano, J., Fauble, V., Tiedemann, R. E., Qiu, Y. H., Coombes, K. R., Cardone, M., Braggio, E., Yin, H., Azorsa, D. O., Mesa, R. A., Stewart, A. K., & Tibes, R. (2014). BCL-2 family proteins as 5-Azacytidine-sensitizing targets and determinants of response in myeloid malignancies. *Leukemia*, *28*(8), 1657-1665.
- Boudard, D., Sordet, O., Vasselon, C., Revol, V., Berthéas, M., Freyssenet, D., Viallet, A., Piselli, S., & Guyotat, D. (2000). Expression and activity of caspase 1 and 3 in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, *14*, 2045-2051.
- Chambers, S. M., Shaw, C. A., Gatz, C., Fisk, C. J., Donehower, L. A., & Goodell, M. A. (2007). Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol*, *5*(8), e201.
- Chatta, G. S., Price, T. H., Allen, R. C., & Dale, D. C. (1994). Effects of In Vivo Recombinant Methionyl Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor on the Neutrophil Response and Peripheral Blood Colony-Forming Cells in Healthy Young and Elderly Adult Volunteers. *Blood*, *84*(9), 2923-2929.

- Chaturvedi, M. M., Sung, B., Yadav, V. R., Kannappan, R., & Aggarwal, B. B. (2011). NF-kappaB addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene*, *30*(14), 1615-1630.
- Cheson, B. D., Greenberg, P. L., Bennett, J. M., Lowenberg, B., Wijermans, P. W., Nimer, S. D., Pinto, A., Beran, M., de Witte, T. M., Stone, R. M., Mittelman, M., Sanz, G. F., Gore, S. D., Schiffer, C. A., & Kantarjian, H. (2006). Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood*, *108*(2), 419-425.
- Čihák, A. (1974). Biological Effects of 5-Azacytidin in Eukaryotes. *Oncology*, *30*, 405-422.
- Čihák, A., & Veselý, J. (1978). Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on DNA Synthesis in Mouse Lymphatic Tissues. *Neoplasma*, *25*(4), 385-393.
- Corey, S. J., Minden, M. D., Barber, D. L., Kantarjian, H., Wang, J. C., & Schimmer, A. D. (2007). Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat Rev Cancer*, *7*(2), 118-129.
- Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, *2*(9), 647-656.
- Craver, B. M., El Alaoui, K., Scherber, R. M., & Fleischman, A. G. (2018). The Critical Role of Inflammation in the Pathogenesis and Progression of Myeloid Malignancies. *Cancers (Basel)*, *10*(4), 1-18.
- Dayyani, F., Conley, A. P., Strom, S. S., Stevenson, W., Cortes, J. E., Borthakur, G., Faderl, S., O'Brien, S., Pierce, S., Kantarjian, H., & Garcia-Manero, G. (2010). Cause of death in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer*, *116*(9), 2174-2179.
- Dill, V., Kauschinger, J., Hauch, R. T., Buschhorn, L., Odinius, T. O., Muller-Thomas, C., Mishra, R., Kyncl, M. C., Schmidt, B., Proding, P. M., Hempel, D., Bellos, F., Hollein, A., Kern, W., Haferlach, T., Slotta-Huspenina, J., Bassermann, F., Peschel, C., Gotze, K. S., Waizenegger, I. C., Hockendorf, U., Jost, P. J., & Jilg, S. (2020). Inhibition of PLK1 by capped-dose volasertib exerts substantial efficacy in MDS and sAML while sparing healthy haematopoiesis. *Eur J Haematol*, *104*(2), 125-137.
- DiNardo, C. D., Pratz, K., Letai, A., Jonas, B. A., Wei, A. H., Thirman, M., Arellano, M., Frattini, M. G., Kantarjian, H., Popovic, R., Chyla, B., Xu, T., Dunbar, M., Agarwal, S. K., Humerickhouse, R., Mabry, M., Potluri, J., Konopleva, M., & Pollyea, D. A. (2018). Safety and preliminary efficacy of venetoclax with decitabine or azacitidine in elderly patients with previously untreated acute myeloid leukaemia: a non-randomised, open-label, phase 1b study. *The Lancet Oncology*, *19*(2), 216-228.
- DiNardo, C. D., Pratz, K., Pullarkat, V., Jonas, B. A., Arellano, M., Becker, P. S., Frankfurt, O., Konopleva, M., Wei, A. H., Kantarjian, H. M., Xu, T., Hong, W. J., Chyla, B., Potluri, J., Pollyea, D. A., & Letai, A. (2019). Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, *133*(1), 7-17.
- DiNardo, C. D., Rausch, C. R., Benton, C., Kadia, T., Jain, N., Pemmaraju, N., Daver, N., Covert, W., Marx, K. R., Mace, M., Jabbour, E., Cortes, J., Garcia-Manero, G., Ravandi, F., Bhalla, K. N., Kantarjian, H., & Konopleva, M. (2018). Clinical experience with the BCL2-inhibitor venetoclax in combination therapy for relapsed and refractory acute myeloid leukemia and related myeloid malignancies. *Am J Hematol*, *93*(3), 401-407.
- Duprez, L., Takahashi, N., Van Hauwermeiren, F., Vandendriessche, B., Goossens, V., Vanden Berghe, T., Declercq, W., Libert, C., Cauwels, A., & Vandenabeele, P.

- (2011). RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity*, 35(6), 908-918.
- Eisenstaedt, R., Penninx, B. W., & Woodman, R. C. (2006). Anemia in the elderly: current understanding and emerging concepts. *Blood Rev*, 20(4), 213-226.
- Ershler, W. B., Sheng, S., McKelvey, J., Artz, A. S., Denduluri, N., Tecson, J., Taub, D. D., Brant, L. J., Ferrucci, L., & Longo, D. L. (2005). Serum erythropoietin and aging: a longitudinal analysis. *J Am Geriatr Soc*, 53(8), 1360-1365.
- Fabbro, D., Cowan-Jacob, S. W., & Moebitz, H. (2015). Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. *Br J Pharmacol*, 172(11), 2675-2700.
- Federica Servida, Davide Soligo, Lorenza Caneva, Francesco Bertolini, Etienne de Harven, Simona Campiglio, Chiara Corsini, & Deliliers, G. L. (1996). Functional and Morphological Characterization of Immunomagnetically Selected CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells. *Stem Cells*, 14(4), 430-438.
- Feng, X., Scheinberg, P., Wu, C. O., Samsel, L., Nunez, O., Prince, C., Ganetzky, R. D., McCoy, J. P., Jr., Maciejewski, J. P., & Young, N. S. (2011). Cytokine signature profiles in acquired aplastic anemia and myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 96(4), 602-606.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., Cornelis, S., & Vandenabeele, P. (2007). RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ*, 14(3), 400-410.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F. K., Chandel, N. S., Cheng, E. H., Chipuk, J. E., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Cohen, G. M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J. R., Czabotar, P. E., D'Angiolella, V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K. M., DeBerardinis, R. J., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Di Virgilio, F., Dixit, V. M., Dixon, S. J., Duckett, C. S., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W. S., Elrod, J. W., Fimia, G. M., Fulda, S., Garcia-Saez, A. J., Garg, A. D., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D. R., Greene, L. A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J. M., Harris, I. S., Hengartner, M. O., Hetz, C., Ichijo, H., Jaattela, M., Joseph, B., Jost, P. J., Juin, P. P., Kaiser, W. J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R. N., Klionsky, D. J., Knight, R. A., Kumar, S., Lee, S. W., Lemasters, J. J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S. A., Lockshin, R. A., Lopez-Otin, C., Lowe, S. W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J. C., Martin, S. J., Martinou, J. C., Medema, J. P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E. A., Molkentin, J. D., Moll, U. M., Munoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nunez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J. M., Pereira, D. M., Pervaiz, S., Peter, M. E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J. H. M., Puthalakath, H., Rabinovich, G. A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C. M. P., Rubinsztein, D. C., Rudel, T., Ryan, K. M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H. U., Sistigu, A., Stockwell, B. R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S. W. G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Vander Heiden, M. G., Villunger, A., Virgin, H. W., Vousden, K. H., Vucic, D., Wagner, E. F., Walczak, H., Wallach,

- D., Wang, Y., Wells, J. A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G., & Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, 25(3), 486-541.
- Ganan-Gomez, I., Wei, Y., Starczynowski, D. T., Colla, S., Yang, H., Cabrero-Calvo, M., Bohannan, Z. S., Verma, A., Steidl, U., & Garcia-Manero, G. (2015). Deregulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 29(7), 1458-1469.
- Garcia, J. S., Wei, A. H., Borate, U., Fong, C. Y., Baer, M. R., Nolte, F., Jurcic, J. G., Jacoby, M. A., Hong, W.-J., Platzbecker, U., Odenike, O., Cunningham, I., Zhou, Y., Tong, B., Hogdal, L., Kamalakar, R., Hutti, J. E., Kye, S., & Garcia-Manero, G. (2020). *Safety, Efficacy, and Patient-Reported Outcomes of Venetoclax in Combination with Azacitidine for the Treatment of Patients with Higher-Risk Myelodysplastic Syndrome: A Phase 1b Study*. Paper presented at the ASH. <https://ash.confex.com/ash/2020/webprogram/Paper139492.html>
- Germing, U., Blum, S., Boch, T., Lübbert, M., Metzgeroth, G., Platzbecker, U., & Pfeilstöcker, M. (2018). Leitlinie: Chronische Myelomonozytäre Leukämie (CMML). *DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.*, 1-21.
- Green, D. R. (2019). The Coming Decade of Cell Death Research: Five Riddles. *Cell*, 177(5), 1094-1107.
- Greenberg, P. L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Sole, F., Bennett, J. M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Levis, A., Malcovati, L., Cazzola, M., Cermak, J., Fonatsch, C., Le Beau, M. M., Slovak, M. L., Krieger, O., Luebbert, M., Maciejewski, J., Magalhaes, S. M., Miyazaki, Y., Pfeilstöcker, M., Sekeres, M., Sperr, W. R., Stauder, R., Tauro, S., Valent, P., Vallespi, T., van de Loosdrecht, A. A., Germing, U., & Haase, D. (2012). Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 120(12), 2454-2465.
- Guan, Q., Gao, X., Wang, J., Sun, Y., & Shekhar, S. (2017). Cytokines in Autoimmune Disease. *Mediators Inflamm*, 2017, 1-2.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hellström-Lindberg, Schmidt-Mende, Forsblom, Christensson, & Zhivotovsky, F. a. (2001). Apoptosis in refractory anaemia with ringed sideroblasts is initiated at the stem cell level and associated with increased activation of caspases. *British Journal of Haematology*, 112, 714-726.
- Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *The New England Journal of Medicine*, 349(21), 2042-2054.
- Höckendorf, U., Yabal, M., Herold, T., Munkhbaatar, E., Rott, S., Jilg, S., Kauschinger, J., Magnani, G., Reisinger, F., Heuser, M., Kreipe, H., Sotlar, K., Engleitner, T., Rad, R., Weichert, W., Peschel, C., Ruland, J., Heikenwalder, M., Spiekermann, K., Slotta-Huspenina, J., Gross, O., & Jost, P. J. (2016). RIPK3 Restricts Myeloid Leukemogenesis by Promoting Cell Death and Differentiation of Leukemia Initiating Cells. *Cancer Cell*, 30(1), 75-91.
- Hofmann W., Platzbecker U., Götze K., Stauder R., Passweg J., & U., G. (2018). Leitlinie: Myelodysplastische Syndrome (MDS). *DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.*, 1-25.

- Invernizzi, R., Pecci, A., Bellotti, L., & Ascari, E. (2001). Expression of p53, Bcl-2 and Ras Oncoproteins and Apoptosis Levels in Acute Leukaemias and Myelodysplastic Syndromes. *Leukemia and Lymphoma*, 42(3), 481-489.
- Issa, J. P. (2010). Epigenetic changes in the myelodysplastic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am*, 24(2), 317-330.
- Jabbour, E., Garcia-Manero, G., Batty, N., Shan, J., O'Brien, S., Cortes, J., Ravandi, F., Issa, J. P., & Kantarjian, H. (2010). Outcome of patients with myelodysplastic syndrome after failure of decitabine therapy. *Cancer*, 116(16), 3830-3834.
- Jilg, S., Hauch, R. T., Kauschinger, J., Buschhorn, L., Odinius, T. O., Dill, V., Muller-Thomas, C., Herold, T., Prodinger, P. M., Schmidt, B., Hempel, D., Bassermann, F., Peschel, C., Gotze, K. S., Hockendorf, U., Haferlach, T., & Jost, P. J. (2019). Venetoclax with azacitidine targets refractory MDS but spares healthy hematopoiesis at tailored dose. *Exp Hematol Oncol*, 8, 1-5.
- Jilg, S., Reidel, V., Muller-Thomas, C., Konig, J., Schauwecker, J., Hockendorf, U., Huberle, C., Gorka, O., Schmidt, B., Burgkart, R., Ruland, J., Kolb, H. J., Peschel, C., Oostendorp, R. A., Gotze, K. S., & Jost, P. J. (2016). Blockade of BCL-2 proteins efficiently induces apoptosis in progenitor cells of high-risk myelodysplastic syndromes patients. *Leukemia*, 30(1), 112-123.
- Jin, T., Yin, Q., Yang, H., Kureshi, R., Spangler, J. B., Jiang, J., Natarajan, K., Margulies, D. H., Liu, W., Zang, X., Wei, H., Li, B., Sun, A., Guo, F., Liu, S., Yang, X., Lin, G., Han, Z., Chai, J., Wang, B., Tian, Y., Fan, X., Ruan, J., Mulero, M. C., Huxford, T., & Ghosh, G. (2019). *Structural Immunology: Advances in Experimental Medicine and Biology* (T. Jin & Q. Yin Eds. Vol. 1172): Springer.
- Jost, P. J., & Hockendorf, U. (2019). Necroinflammation emerges as a key regulator of hematopoiesis in health and disease. *Cell Death Differ*, 26(1), 53-67.
- Kelliher, M. A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B. Z., & Leder, P. (1998). The Death Domain Kinase RIP Mediates the TNF-Induced NF-kappaB Signal. *Immunity*, 8, 297-303.
- Kotsianidis, I., Papageorgiou, S. G., Pappa, V., Galanopoulos, A. G., Viniou, N. A., Vassilakopoulos, T. P., Papoutselis, M., Vrachiolias, G., Papadopoulos, V., Diamantopoulos, P. T., Tsokanas, D., Kourakli, A., & Symeonidis, A. (2019). Azacytidine Failure Revisited: an Appraisal Based on Real-Life Data from the MDS Registry of the Hellenic Myelodysplastic Syndrome Study Group (HMDS). *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 11(1), 1-10.
- Letai, A. G. (2008). Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 8(2), 121-132.
- Linkermann, A., & Green, D. R. (2014). Necroptosis. *N Engl J Med*, 370(5), 455-465.
- Liu, Q., Sabnis, Y., Zhao, Z., Zhang, T., Buhrlage, S. J., Jones, L. H., & Gray, N. S. (2013). Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cysteinome. *Chem Biol*, 20(2), 146-159.
- Luca Malcovati, E. H. m.-L., David Bowen, Lionel Adès, Jaroslav Cermak, Consuelo del Cañizo, Matteo G. Della Porta, Pierre Fenaux, Norbert Gattermann, Ulrich Germing, Joop H. Jansen, Moshe Mittelman, Ghulam Mufti, Uwe Platzbecker, Guillermo F. Sanz, Dominik Selleslag, Mette Skov-Holm, Reinhard Stauder, Argiris Symeonidis, Arjan A. van de Loosdrecht, Theo de Witte and Mario Cazzola. (2013). Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*, 122(17), 2943-2964.
- Ma, X., Does, M., Raza, A., & Mayne, S. T. (2007). Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer*, 109(8), 1536-1542.

- Maher Albitar, Taghi Manshour, Yu Shen, Diane Liu, Miloslav Beran, Hagop M. Kantarjian, Anna Rogers, Iman Jilani, Chung Wu Lin, Sherry Pierce, Emil J. Freireich, & Estey, E. H. (2002). Myelodysplastic syndrome is not merely "preleukemia". *Blood*, *100*(3), 791-798.
- Malcovati, L., Della Porta, M. G., Strupp, C., Ambaglio, I., Kuendgen, A., Nachtkamp, K., Travaglino, E., Invernizzi, R., Pascutto, C., Lazzarino, M., Germing, U., & Cazzola, M. (2011). Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica*, *96*(10), 1433-1440.
- Mandal, P., Berger, S. B., Pillay, S., Moriwaki, K., Huang, C., Guo, H., Lich, J. D., Finger, J., Kasparcova, V., Votta, B., Ouellette, M., King, B. W., Wisnoski, D., Lakdawala, A. S., DeMartino, M. P., Casillas, L. N., Haile, P. A., Schon, C. A., Marquis, R. W., Upton, J., Daley-Bauer, L. P., Roback, L., Ramia, N., Dovey, C. M., Carette, J. E., Chan, F. K., Bertin, J., Gough, P. J., Mocarski, E. S., & Kaiser, W. J. (2014). RIP3 induces apoptosis independent of pronecrotic kinase activity. *Mol Cell*, *56*(4), 481-495.
- Maung, Z. T., MacLean, F. R., Reid, M. M., Pearson, A. D. J., Proctor, S. J., & Hamilton, P. J. a. H., A. G. (1994). The relationship between bcl-2 expression and response to chemotherapy in acute leukaemia. *British J Haematol*, *88*, 105-109.
- MDS-Register. (2018). WHO Klassifikation MDS. Abgerufen von <http://www.mds-register.de/who-klassifikation/>
- Montalban-Bravo, G., & Garcia-Manero, G. (2018). Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*, *93*(1), 129-147.
- Moriwaki, K., & Chan, F. K. (2013). RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev*, *27*(15), 1640-1649.
- Moujalled, D. M., Cook, W. D., Okamoto, T., Murphy, J., Lawlor, K. E., Vince, J. E., & Vaux, D. L. (2013). TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death Dis*, *4*, e465.
- Müller-Thomas, C., Rudelius, M., Rondak, I. C., Haferlach, T., Schanz, J., Huberle, C., Schmidt, B., Blaser, R., Kremer, M., Peschel, C., Germing, U., Platzbecker, U., & Gotze, K. (2014). Response to azacitidine is independent of p53 expression in higher-risk myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia. *Haematologica*, *99*(10), e179-181.
- Neukirchen, J., Schoonen, W. M., Strupp, C., Gattermann, N., Aul, C., Haas, R., & Germing, U. (2011). Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Dusseldorf MDS-registry. *Leuk Res*, *35*(12), 1591-1596.
- Newton, K., Dugger, D. L., Wickliffe, K. E., Kapoor, N., de Almagro, M. C., Vucic, D., Komuves, L., Ferrando, R. E., French, D. M., Webster, J., Roose-Girma, M., Warming, S., & Dixit, V. M. (2014). Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science*, *343*(6177), 1357-1360.
- P. Greenberg, C. Cox, M. LeBeau, P. Fenaux, P. Morel, G. Sanz, M. Sanz, T. Vallespi, T. Hamblin, D. Oscier, K. Ohyashiki, K. Toyama, C. Aul, & Bennett, G. M. a. J. (1997). International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood*, *89*(6), 2079-2088.
- Pan, R., Hogdal, L. J., Benito, J. M., Bucci, D., Han, L., Borthakur, G., Cortes, J., DeAngelo, D. J., Debose, L., Mu, H., Dohner, H., Gaidzik, V. I., Galinsky, I., Golfman, L. S., Haferlach, T., Harutyunyan, K. G., Hu, J., Levenson, J. D., Marcucci, G., Muschen, M., Newman, R., Park, E., Ruvolo, P. P., Ruvolo, V.,

- Ryan, J., Schindela, S., Zweidler-McKay, P., Stone, R. M., Kantarjian, H., Andreeff, M., Konopleva, M., & Letai, A. G. (2014). Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia. *Cancer Discov*, 4(3), 362-375.
- Pang, W. W., Pluvinage, J. V., Price, E. A., Sridhar, K., Arber, D. A., Greenberg, P. L., Schrier, S. L., Park, C. Y., & Weissman, I. L. (2013). Hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodysplastic syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(8), 3011-3016.
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gundem, G., Van Loo, P., Yoon, C. J., Ellis, P., Wedge, D. C., Pellagatti, A., Shlien, A., Groves, M. J., Forbes, S. A., Raine, K., Hinton, J., Mudie, L. J., McLaren, S., Hardy, C., Latimer, C., Della Porta, M. G., O'Meara, S., Ambaglio, I., Galli, A., Butler, A. P., Walldin, G., Teague, J. W., Quek, L., Sternberg, A., Gambacorti-Passerini, C., Cross, N. C., Green, A. R., Boultonwood, J., Vyas, P., Hellstrom-Lindberg, E., Bowen, D., Cazzola, M., Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome, C. (2013). Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 122(22), 3616-3627.
- Park, C.-M., Milan, B., Adickes, J., Bauch, J., Ding, H., Kunzer, A., Marsh, K. C., Nimmer, P., Shoemaker, A. R., Song, X., Tahir, S. K., Tse, C., Wang, X., Wendt, M. D., Yang, X., Zhang, H., Fesik, S. W., Rosenberg, S. H., & Elmore, S. W. (2008). Discovery of an Orally Bioavailable Small Molecule Inhibitor of Prosurvival B-Cell Lymphoma 2 Proteins. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(21), 6902-6915.
- Park, S., & Götze, K. (2018). Erythropoiesis-Stimulating Agents in Low-Risk MDS *Myelodysplastic Syndromes* (pp. 83-95).
- Parker, J. E., & Mufti, G. J. (1998). Ineffective Haematopoiesis And Apoptosis In Myelodysplastic Syndromes. *British J Haematol*, 101, 220-230.
- Parker, J. E., Mufti, G. J., Rasool, F., Mijovic, A., Devereux, S., & Pagliuca, A. (2000). The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood*, 96(12), 3932-3938.
- Pasparakis, M., & Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517(7534), 311-320.
- Perner, F., Perner, C., Ernst, T., & Heidel, F. H. (2019). Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation. *Cells*, 8(8).
- Pierre Fenau, Ghulam J Mufti, Eva Hellstrom-Lindberg, Valeria Santini, C. F., Aristoteles Giagounidis, Robert Schoch, Norbert Gattermann, Guillermo Sanz, Alan List, Steven D Gore, John F Seymour, John M Bennett, John Byrd, Jay Backstrom, Linda Zimmerman, David McKenzie, C L Beach, & Silverman, L. R. (2009). Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*, 10, 223-232.
- Prebet, T., Gore, S. D., Esterni, B., Gardin, C., Itzykson, R., Thepot, S., Dreyfus, F., Rauzy, O. B., Recher, C., Ades, L., Quesnel, B., Beach, C. L., Fenau, P., & Vey, N. (2011). Outcome of high-risk myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure. *J Clin Oncol*, 29(24), 3322-3327.
- Raza, A., Alvi, S., Broady-Robinson, L., Showel, M., Cartlidge, J., Mundle, S. D., Shetty, V. T., Borok, R. Z., Dar, S. E., Chopra, H. K., Span, L., Parcharidou, A., Hines, C., Gezer, S., Venugopal, P., Loew, J., Showel, J., Alston, D., Hernandez, B., Rifkin, S., Robin, E., Shah, R., & Gregory, S. A. (1997). Cell

- Cycle Kinetic Studies in 68 Patients With Myelodysplastic Syndromes Following Intravenous Iodo- And/or Bromodeoxyuridine. *Exp Hematol*, 25(6), 530-535.
- Raza, A., & Galili, N. (2012). The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Cancer*, 12(12), 849-859.
- Raza, A., Gezer, S., Mundle, S., Xue-Zhi, G., Sairah, A., Borok, R., Rifkin, S., Iftikhar, A., Shetty, V., Paracharidou, A., Loew, J., Marcus, B., Khan, Z., Chaney, C., Showel, J., Gregory, S., & Preisler, H. (1995). Apoptosis in Bone Marrow Biopsy Samples Involving Stromal and Hematopoietic Cells in 50 Patients With Myelodysplastic Syndromes. *Blood*, 86(1), 268-276.
- Reed, J. C. (2008). Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood*, 111(7), 3322-3330.
- Reidel, V., Kauschinger, J., Hauch, R. T., Müller-Thomas, C., Nadarajah, N., Burgkart, R., Schmidt, B., Hempel, D., Jacob, A., Slotta-Huspenina, J., Höckendorf, U., Peschel, C., Kern, W., Haferlach, T., Götze, K. S., Jilg, S., & Jost, P. J. (2018). Selective inhibition of BCL-2 is a promising target in patients with high-risk myelodysplastic syndromes and adverse mutational profile. *Oncotarget*, 9(25), 17270-17281.
- Rickard, J. A., O'Donnell, J. A., Evans, J. M., Lalaoui, N., Poh, A. R., Rogers, T., Vince, J. E., Lawlor, K. E., Ninnis, R. L., Anderton, H., Hall, C., Spall, S. K., Pheese, T. J., Abud, H. E., Cengia, L. H., Corbin, J., Mifsud, S., Di Rago, L., Metcalf, D., Ernst, M., Dewson, G., Roberts, A. W., Alexander, W. S., Murphy, J. M., Ekert, P. G., Masters, S. L., Vaux, D. L., Croker, B. A., Gerlic, M., & Silke, J. (2014). RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis. *Cell*, 157(5), 1175-1188.
- Scarfo, L., & Ghia, P. (2013). Reprogramming cell death: BCL2 family inhibition in hematological malignancies. *Immunol Lett*, 155(1-2), 36-39.
- Schanz, J., Cevik, N., Fonatsch, C., Bräulke, F., Shirneshan, K., Bacher, U., & Haase, D. (2018). Detailed analysis of clonal evolution and cytogenetic evolution patterns in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and related myeloid disorders. *Blood Cancer J*, 8(3), 1-10.
- Schanz, J., Tuchler, H., Sole, F., Mallo, M., Luno, E., Cervera, J., Granada, I., Hildebrandt, B., Slovak, M. L., Ohyashiki, K., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nosslinger, T., Valent, P., Giagounidis, A., Aul, C., Lubbert, M., Stauder, R., Krieger, O., Garcia-Manero, G., Faderl, S., Pierce, S., Le Beau, M. M., Bennett, J. M., Greenberg, P., Germing, U., & Haase, D. (2012). New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*, 30(8), 820-829.
- Shetty, V., Hussaini, S., Broady-Robinson, L., Allampallam, K., Mundle, S., Borok, R., Broderick, E., Mazzoran, L., Zorat, F., & Raza, A. (2000). Intramedullary apoptosis of hematopoietic cells in myelodysplastic syndrome patients can be massive: apoptotic cells recovered from high-density fraction of bone marrow aspirates. *Blood*, 96(4), 1388-1392.
- Sierra, J., Pérez, W. S., Rozman, C., Carreras, E., Klein, J. P., Rizzo, J. D., Davies, S. M., Lazarus, H. M., Bredeson, C. N., Marks, D. I., Canals, C., Boogaerts, M. A., Goldman, J., Champlin, R. E., Keating, A., Weisdorf, D. J., de Witte, T. M., & Horowitz, M. M. (2002). Bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment for myelodysplasia. *Blood*, 100(6), 1997-2004.
- 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. *J Clin Oncol*, *20*(10), 2429-2440.
- Silverman, L. R., McKenzie, D. R., Peterson, B. L., De Castro, C. M., Ellerton, J., Knapp, K. N., Beach, C., & Larson, R. A. (2005). Response Rates Using International Working Group (IWG) Criteria in Patients with Myelodysplastic Syndromes (MDS) Treated with Azacitidine. *Blood*, *106*(11), 2526.
- Smol, T. (2015). inv(3)(q21q26) RPN1/MECOM. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, *19*(9), 590-593.
- Souers, A. J., Levenson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., Chen, J., Dayton, B. D., Ding, H., Enschede, S. H., Fairbrother, W. J., Huang, D. C., Hymowitz, S. G., Jin, S., Khaw, S. L., Kovar, P. J., Lam, L. T., Lee, J., Maecker, H. L., Marsh, K. C., Mason, K. D., Mitten, M. J., Nimmer, P. M., Oleksijew, A., Park, C. H., Park, C. M., Phillips, D. C., Roberts, A. W., Sampath, D., Seymour, J. F., Smith, M. L., Sullivan, G. M., Tahir, S. K., Tse, C., Wendt, M. D., Xiao, Y., Xue, J. C., Zhang, H., Humerickhouse, R. A., Rosenberg, S. H., & Elmore, S. W. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med*, *19*(2), 202-208.
- Stifter, G., Heiss, S., Gastl, G., Tzankov, A., & Stauder, R. (2005). Over-expression of tumor necrosis factor-alpha in bone marrow biopsies from patients with myelodysplastic syndromes: relationship to anemia and prognosis. *Eur J Haematol*, *75*, 485-491.
- Takahashi, N., Duprez, L., Grootjans, S., Cauwels, A., Nerinckx, W., DuHadaway, J. B., Goossens, V., Roelandt, R., Van Hauwermeiren, F., Libert, C., Declercq, W., Callewaert, N., Prendergast, G. C., Degterev, A., Yuan, J., & Vandenabeele, P. (2012). Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell Death Dis*, *3*, e437.
- Tang, D., Kang, R., Berghe, T. V., Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res*, *29*(5), 347-364.
- Tefferi, A., & Vardiman, J. W. (2009). Myelodysplastic Syndromes. *New England Journal of Medicine*, *361*(19), 1872-1885.
- Tsimberidou, A. M., Estey, E., Wen, S., Pierce, S., Kantarjian, H., Albitar, M., & Kurzrock, R. (2008). The prognostic significance of cytokine levels in newly diagnosed acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer*, *113*(7), 1605-1613.
- U.S. Food and Drug Administration. (2008). *Full Prescribing Information: Vidaza*.
- U.S. Food and Drug Administration. (2018). *Full Describing Information: Venetoclax*.
- Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., Harris, N. L., Le Beau, M. M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A., & Bloomfield, C. D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, *114*(5), 937-951.
- Vaux, D. L., Cory, S., & Adams, J. M. (1988). BCL-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, *335*, 440-442.
- Verhoef, G. E., De Schouwer, P., Ceuppens, J. L., Van Damme, J., Goossens, W., & Boogaerts, M. A. (1992). Measurement of Serum Cytokine Levels in Patients With Myelodysplastic Syndromes. *Leukemia*, *6*(12), 1268-1272.

- Vlahopoulos, S. A. (2017). Aberrant control of NF-kappaB in cancer permits transcriptional and phenotypic plasticity, to curtail dependence on host tissue: molecular mode. *Cancer Biol Med*, 14(3), 254-270.
- Wagner, P. N., Shi, Q., Salisbury-Ruf, C. T., Zou, J., Savona, M. R., Fedoriw, Y., & Zinkel, S. S. (2019). Increased Ripk1-mediated bone marrow necroptosis leads to myelodysplasia and bone marrow failure in mice. *Blood*, 133(2), 107-120.
- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., & Gatto, G. J., Jr. (2005). Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44(45), 7342-7372.
- Walter, M. J., Dong Shen, M. D., Ph.D., , Li Ding, P. D., Jin Shao, M. S., Daniel C. Koboldt, M. S., Ken Chen, P. D., David E. Larson, P. D., Michael D. McLellan, B. S., David Dooling, P. D., Rachel Abbott, B. S., Robert Fulton, M. S., Vincent Magrini, P. D., Heather Schmidt, B. S., Joelle Kalicki-Veizer, B. S., Michelle O'Laughlin, B. S., Xian Fan, M. S., Marcus Grillot, B. S., Sarah Witowski, M. A., Sharon Heath, John L. Frater, M. D., Eades, W., Tomasson, M., Westervelt, P., DiPersio, J. F., Link, D. C., Mardis, E. R., Ley T.J., R.K., W., & Graubert, T. A. (2012). Clonal Architecture of Secondary Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 366(12), 1090-1098.
- Walter, M. J., Shen, D., Shao, J., Ding, L., White, B. S., Kandoth, C., Miller, C. A., Niu, B., McLellan, M. D., Dees, N. D., Fulton, R., Elliot, K., Heath, S., Grillot, M., Westervelt, P., Link, D. C., DiPersio, J. F., Mardis, E., Ley, T. J., Wilson, R. K., & Graubert, T. A. (2013). Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 27(6), 1275-1282.
- Wei, A., Strickland, S. A., Roboz, G. J., Hou, J.-Z., Fiedler, W., Lin, T. L., Walter, R. B., Enjeti, A., Chyla, B., Popovic, R., Fakouhi, K., Shah, P., Dunbar, M., Xu, T., Mabry, M., & Hayslip, J. (2017). Phase 1/2 Study of Venetoclax with Low-Dose Cytarabine in Treatment-Naive, Elderly Patients with Acute Myeloid Leukemia Unfit for Intensive Chemotherapy: 1-Year Outcomes (ASH abstract #890). *Blood*, 130, 890.
- Wei, A. H., Tiong, I. S., Roberts, A. W., Fong, C. Y., Chua, C. C., Ting, S. B., Nguyen, J., Yuen, F., Hall, R., Flemming, S., & Reynolds, J. (2018). Chemotherapy and venetoclax in elderly AML trial (CAVEAT): a phase 1B dose escalation study examining modified intensive chemotherapy in fit elderly patients (EHA abstract #S1564). *HemaSphere*, 2.
- Westphal, D., Kluck, R. M., & Dewson, G. (2014). Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death Differ*, 21(2), 196-205.
- Woll, Petter S., Kjällquist, U., Chowdhury, O., Doolittle, H., Wedge, David C., Thongjuea, S., Erlandsson, R., Ngara, M., Anderson, K., Deng, Q., Mead, Adam J., Stenson, L., Giustacchini, A., Duarte, S., Giannoulatou, E., Taylor, S., Karimi, M., Scharenberg, C., Mortera-Blanco, T., Macaulay, Iain C., Clark, S.-A., Dybedal, I., Josefsen, D., Fenaux, P., Hokland, P., Holm, Mette S., Cazzola, M., Malcovati, L., Tauro, S., Bowen, D., Boultonwood, J., Pellagatti, A., Pimanda, John E., Unnikrishnan, A., Vyas, P., Göhring, G., Schlegelberger, B., Tobiasson, M., Kvalheim, G., Constantinescu, Stefan N., Nerlov, C., Nilsson, L., Campbell, Peter J., Sandberg, R., Papaemmanuil, E., Hellström-Lindberg, E., Linnarsson, S., & Jacobsen, Sten Eirik W. (2014). Myelodysplastic Syndromes Are Propagated by Rare and Distinct Human Cancer Stem Cells In Vivo. *Cancer Cell*, 25(6), 794-808.
- Wu, H., Vaux, D. L., Jiang, X., Lucas, C. L., Lenardo, M. J., Liu, Q., Chi, X., Leber, B., Andrews, D. W., Vucic, D., Baran, K., Rodriguez, D., Green, D., Cusack, C. L.,

- Annis, R. P., Kole, A. J., Deshmukh, M., Lindblom, K., Kornbluth, S., Chan, F. K., Gavathiotis, E., & Li, J. (2014). *Cell Death: Mechanism and Disease* (H. Wu Ed.).
- Xia, Y., Shen, S., & Verma, I. M. (2014). NF-kappaB, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res*, 2(9), 823-830.
- Yabal, M., Muller, N., Adler, H., Knies, N., Gross, C. J., Damgaard, R. B., Kanegane, H., Ringelhan, M., Kaufmann, T., Heikenwalder, M., Strasser, A., Gross, O., Ruland, J., Peschel, C., Gyrd-Hansen, M., & Jost, P. J. (2014). XIAP restricts TNF- and RIP3-dependent cell death and inflammasome activation. *Cell Rep*, 7(6), 1796-1808.
- Yip, K. W., & Reed, J. C. (2008). Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, 27(50), 6398-6406.
- Zeidan, A. M., Pollyea, D. A., Garcia, J. S., Brunner, A. M., Roncolato, F., Borate, U., Odenike, O., Bajel, A., Watson, A. M., Götze, K., Nolte, F., Tan, P., Al-Ali, H. K., Hong, W.-J., Zhou, Y., Gressick, L., Ainsworth, W., Harb, J., Popovic, R., Salem, A. H., Hayslip, J., Swords, R., & Garcia-Manero, G. (2020). *A Phase 1B Study Evaluating The Safety And Efficacy Of Venetoclax In Combination With Azacitidine For The Treatment Of Relapsed/Refractory Myelodysplastic Syndrome*. Paper presented at the EHA25.
<https://library.ehaweb.org/eha/2020/eha25th/295008/amer.m.zeidan.a.phase.1b.study.evaluating.the.safety.and.efficacy.of.html?f=listing%3D0%2Abrowseby%3D8%2Asortby%3D1%2Ase-arch%3Dzeidan>

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pyrimidin-Analoga 5-Azacytidin und Cytidin (angelehnt an Čihák, 1974)

Abbildung 2: RIPK3-Proteinexpression ist in frühen MDS-Stadien und in sAML erhöht

Abbildung 3: RIPK3-Proteinexpression im Knochenmark ist MDS-stadienspezifisch

Abbildung 4: RIPK3-Proteinexpression ist erhöht im frühen CMML-Stadium gegenüber gesunden Kontrollproben und spätem CMML-Stadium

Abbildung 5: RIPK1- und RIPK3-Inhibition hat keine kurzfristigen, zytotoxischen Auswirkungen auf die Viabilität von gesunden Kontrollproben und erkrankten MDS-/sAML-Zellen

Abbildung 6: RIPK1- und RIPK3-Inhibition haben keinen signifikanten inhibitorischen oder supportiven Effekt auf die Koloniebildungsfähigkeit des gesunden Knochenmarks

Abbildung 7: Effekte der RIPK3-Inhibition auf das Knochenmark von MDS-/sAML-Patienten sind stadienspezifisch different

Abbildung 8: RIPK1-Inhibition verbessert die Koloniebildungsfähigkeit in MDS-/sAML-Knochenmark

Abbildung 9: 72h Toxizität der Kombinationsbehandlung aus Venetoclax und 5-Azacytidin ist dosisabhängig

Abbildung 10: Niedrigdosis-Kombinationsbehandlung aus Venetoclax und 5-Azacytidin führt nicht zu Veränderungen der Koloniebildungsfähigkeit gesunder Knochenmarkzellen

Abbildung 11: Niedrigdosis-Kombinationsbehandlung aus Venetoclax und 5-Azacytidin induziert effektiv Zelltod in der CD34+/CD45+ Stamm-/Vorläuferpopulation von MDS-/sAML-BMMNCs

Abbildung 12: Niedrigdosis-Kombinationsbehandlung aus Venetoclax und 5-Azacytidin reduziert die Koloniebildungsfähigkeit von MDS-/sAML-BMMNCs nach HMA-Failure signifikant

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation Myelodysplastischer Syndrome nach WHO 2016 (Arber *et al.*, 2016; Tabelle modifiziert nach MDS-Register, 2018)

Tabelle 2: IPSS-Kriterien, Berechnung und Risikogruppen-Klassifikation (Tabelle modifiziert nach MDS-Register, 2018; P. Greenberg *et al.*, 1997)

Tabelle 3: IPSS-r-Kriterien, Berechnung und Risikogruppen-Klassifikation (Tabelle modifiziert nach Greenberg *et al.*, 2012; MDS-Register, 2018)

Tabelle 4: WPSS-Kriterien, Berechnung und Risikogruppen-Klassifikation (Tabelle modifiziert nach Malcovati *et al.*, 2011; MDS-Register, 2018; Vardiman *et al.*, 2009)

Tabelle 5: Überarbeitete IWG-Kriterien (2006) zur Klassifikation von Therapieansprechen in MDS gegenüber 5-Azacytidin (Cheson *et al.*, 2006)

Tabelle 6: Klinische Annotierung der analysierten Patienten in Versuchen zu RIPK1 & RIPK3

Tabelle 7: Klinische Annotierung der analysierten Patienten in Versuchen zu Venetoclax und 5-Azacytidin

12 Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. Christian Peschel und Herrn Univ.-Prof. Dr. Bassermann für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation an der III. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München durchzuführen. Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Philipp Jost für die Vergabe, enge Betreuung und vielschichtige Unterstützung in der Arbeit an diesem Projekt. PD Dr. med. Stefanie Jilg kann ich nicht genug danken für ihre ausdauernde, umfangreiche Betreuung und die persönliche wie fachliche Förderung meiner Entwicklung im Rahmen dieser Promotion und weit darüber hinaus. PD Dr. Dr. Teichert-von Lüttichau danke ich für die wissenschaftliche Beratung des Forschungsprojekts und ihr anhaltendes Mentoring meiner fachlichen Entwicklung. Großer Dank gilt allen Kolleg:innen der Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Insbesondere hervorheben möchte ich dabei Ulrike Höckendorf, deren umfassendes technisches und naturwissenschaftliches Wissen mir oft entscheidend weiterhalf. Meinen AG-Kolleg:innen Veronika Dill, Johanna Kauschinger, Lars Buschhorn und Timo Odinius möchte ich für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit danken. Ich möchte mich zudem bei PD Dr. Julia Slotta-Huspenina bedanken, die die Schnitte zur RIPK3-Proteinexpression analysiert und das Projekt wissenschaftlich beraten hat. Größter Dank gilt den zahlreichen Patienten, die mir die Forschung an den ihnen entnommenen Proben erlaubten, und den vielen Kooperationspartnern, die mir diese zur Verfügung stellten. Ohne sie würden dieses Projekt und die damit verbundenen Erkenntnisse nicht existieren. Mein großer Dank gilt zudem der deutschen José Carreras Leukämie Stiftung und der DGHO für ihre großzügige Unterstützung meiner Arbeit. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern Regine Hauch und Dr. Michael Hauch, sowie Erika Triesch, Richard Spelberg und Nicola Kolossa bedanken, die mich im Rahmen meiner Ausbildung, meiner Forschungsarbeit und darüber hinaus in meiner persönlichen Entwicklung in jeglicher Hinsicht unterstützt und geprägt haben.