



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

**Aktivierung des programmierten Zelltodes als Therapieoption
im Hypereosinophilen Syndrom**

Timo O. Odinius

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

Vorsitz: Prof. Dr. Angela Krackhardt

Prüfer*innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Philipp J. Jost
2. apl. Prof. Dr. Knut Brockow

Die Dissertation wurde am 12.01.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.05.2022 angenommen.

Diese Dissertation wurde durch das Promotionsprogramm „Translationale Medizin“ der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München und die Else-Kröner-Fresenius-Stiftung gefördert.



„Der Horizont ist nur die Grenze unserer Sicht“

(Dame Cicely Mary Stode Saunders, OM, DBE)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	4
1. EINLEITUNG	7
1.1. HYPEREOSINOPHILIE ALS MULTIFORMES KRANKHEITSBILD	8
1.1.1. Definition und Epidemiologie von Hypereosinophilie und hypereosinophileassozierten Erkrankungen	8
1.1.2. Klinische Manifestationen von Hypereosinophilie.....	9
1.1.3. Klassifikationssystem der Hypereosinophilen Syndrome nach WHO 2019.....	10
1.1.3.1. Reaktive Hypereosinophilie	13
1.1.3.2. WHO-definierte myeloische Neoplasien mit Eosinophilie (MPN-Eo).....	14
1.1.3.3. Myeloische/lymphatische Neoplasien mit Eosinophilie und Rearrangement von <i>PDGFRA</i> , <i>PDGFRB</i> , <i>FGFR1</i> oder <i>PCM1-JAK2</i> (MLN-Eo).....	15
1.1.3.4. Chronische Eosinophilenleukämie, nicht weiter klassifiziert (CEL-NOS) ...	17
1.1.3.5. Lymphocyte-variant Hypereosinophilie (L-HES).....	17
1.1.3.6. Hypereosinophiles Syndrom (HES).....	18
1.1.4. Differentialdiagnose Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA)	19
1.2. APOPTOSERESISTENZ ALS MERKMAL MALIGNER ZELLEN UND THERAPEUTISCHE MÖGLICHKEITEN	20
1.2.1. Molekularbiologische Grundlagen der Apoptose	20
1.2.1.1. Der extrinsische Apoptoseweg	21
1.2.1.2. Der intrinsische Apoptoseweg	21
1.2.1.3. Die BCL-2-Protein Familie	22
1.2.2. Deregulation von BCL-2-Proteinen in malignen Zellen und Modulation von Zelltodmechanismen als Therapieoption.....	24
1.2.3. BH3-Mimetika und ihr Wirkmechanismus.....	25
1.2.4. Zelltodregulierende Mechanismen in eosinophilen Granulozyten	28
1.3. FRAGESTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	29
2. MATERIAL UND METHODEN	31
2.1. ARBEITSMATERIALIEN	31
2.1.1. Chemikalien und biogene Substanzen	31
2.1.2. Reagenzien.....	31

2.1.3.	Pufferlösungen.....	32
2.1.4.	Zelllinien, Medienzusätze, Zellkulturmedien	33
2.1.5.	Antikörper	34
2.1.6.	Oligonukleotide	35
2.1.7.	Molekularbiologische Kitsysteme.....	36
2.1.8.	Standardgeräte	36
2.1.9.	Verbrauchsmaterialien	37
2.1.10.	Verwendete Software	38
2.2.	STUDIENMATERIAL.....	38
2.2.1.	Untersuchungsmaterial.....	38
2.2.2.	Studienpopulation und Patientencharakteristika.....	39
2.2.3.	Gesunde Kontrollkohorte	43
2.3.	METHODEN.....	45
2.3.1.	Zellbiologische Methoden Teil I: Zellpräparation	45
2.3.1.1.	Präparation und Kultur primärer humaner Knochenmarkszellen.....	45
2.3.1.2.	Präparation und Kultur eosinophiler Granulozyten aus peripherem Blut....	46
2.3.1.3.	Präparation und Kultur primärer humaner Knochenmarkszellen aus Hüftexplantaten.....	46
2.3.2.	Zellbiologische Methoden Teil II: Inhibitionsversuche	47
2.3.2.1.	Stimulationsexperimente mit BH3-Mimetika	47
2.3.2.2.	Untersuchung koloniebildender Einheiten	47
2.3.2.3.	RNS-Extraktion	48
2.3.2.4.	cDNS Synthese mittels reverser Transkription	48
2.3.2.5.	Auswahl der Primer mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese	48
2.3.2.6.	Quantitative Echtzeit-PCR	49
2.3.3.	Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie	50
2.3.4.	Interleukin-5 Messung mittels ELISA.....	51
2.4.	STATISTISCHE AUSWERTUNG	51
3.	ERGEBNISSE	52
3.1.	GENEXPRESSION ZENTRALER BCL-2 PROTEINE IN EOSINOPHILEN GRANULOZYTEN	52

3.1.1.	Die Genexpressionslevel von Morrbid und BIM unterscheiden sich nicht zwischen aberranten und gesunden eosinophilen Granulozyten	52
3.1.2.	Eosinophile Granulozyten von Patient*innen mit Hypereosinophilie zeigen einen fast vollständigen Verlust des proapoptotischen PUMA	54
3.1.3.	Die Genexpression des antiapoptotischen BCL-2 ist in Eosinophilen gesunder Spender*innen signifikant höher als in der Patientenkohorte	55
3.2.	ZELLTODINDUKTION IN EOSINOPHILEN GRANULOZYTEN UND MYELOISCHEN VORLÄUFERZELLEN MITTELS BH3-MIMETIKA	57
3.2.1.	Die Viabilität eosinophiler Granulozyten nach BCL-2-Proteinblockade mit BH3-Mimetika ist unabhängig vom Interleukin-5 Plasmaspiegel	58
3.2.2.	Eosinophile Granulozyten von Patient*innen mit Hypereosinophilie sind resistent gegenüber Zelltodinduktion mit BH3-Mimetika	59
3.2.3.	Der MCL1-Inhibitor S63845 induziert selektiv Apoptose in myeloischen Vorläuferzellen von Patient*innen mit Hypereosinophilie unter Schonung der gesunden Hämatopoese	62
4.	DISKUSSION	65
5.	ZUSAMMENFASSUNG	69
	LITERATURVERZEICHNIS	70
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	76
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	78
	TABELLENVERZEICHNIS	83
	DANKSAGUNG	84

1. Einleitung

Eosinophile Granulozyten sind Immunzellen des angeborenen Immunsystems, die 1879 von Paul Ehrlich das erste Mal morphologisch beschrieben wurden [1] und eine bis heute nicht abschließend geklärte Rolle in der lokalen Immunantwort, beim Geweberemodelling und in der Gewebereparatur spielen [2]. Klinisch spielen sie vor allem in der Allergologie, in der Rheumatologie, aber auch in der Hämatologie eine nicht zu vernachlässigende Rolle [3, 4].

Bei dauerhaft erhöhten Werten von über $0,5 \times 10^9$ Eosinophilen pro Liter wird von Eosinophilie gesprochen. Hypereosinophilie ist definiert ab einer absoluten Eosinophilenzahl von über $1,5 \times 10^9$ Eosinophilen pro Liter. Vor allem in der Hämatologie gehen einige maligne Krankheitsentitäten mit einer Erhöhung der absoluten und relativen Eosinophilenzahl im peripheren Blut und/oder Knochenmark einher. Nach Ausschluss von reaktiven Blutbildveränderungen („sekundär“), wie beispielsweise bei parasitären Infektionen, sind weitergehende molekulargenetische und zytogenetische Untersuchungen des peripheren Blutes und des Knochenmarkes nötig, um präzise zwischen Chronischer Eosinophilenleukämie (CEL-NOS), Myeloider und lymphatischer Neoplasie mit Hypereosinophilie (MLN-Eo), andere Myeloproliferative Neoplasien mit Hypereosinophilie (MPN-Eo) und dem Hypereosinophilen Syndrom (HES) unterscheiden zu können [5]. Auch die Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA) stellt eine mögliche klinische Differenzialdiagnose dar, selbst bei Patient*innen mit negativem ANCA-Status (ANCA: engl. *anti-neutrophilic cytoplasmic antibody*) [6].

Während bei niedrigeren Eosinophilenzahlen die Patient*innen meist symptomfrei bleiben, können die klinischen Symptome einer Hypereosinophilie bei hoher Zelllast in ihrer Art und ihrem Schweregrad sehr unterschiedlich sein. Durch die recht unspezifische Gewebemigration von eosinophilen Granulozyten sind Organbeteiligungen im gesamten menschlichen Organismus möglich - Lunge, Haut, peripheres und zentrales Nervensystem sowie Herz sind die dabei am häufigsten betroffenen Organsysteme [7-12]. Die Therapieoptionen sind oft limitiert, Ziel ist meist eine Symptomkontrolle und eine Zytoreduktion mittels nebenwirkungsreichen Cortikosteroiden. Für die MLN-Eo mit Fusionstranskripten aus *PDGFRA* (engl. *platelet-derived growth factor A*) und *PDGFRB* (engl. *platelet-derived growth factor B*) gibt es mit Imatinib ein zugelassenes zielgerichtetes Therapieregime [5]. Neue Phase-III-Studien zu Interleukin-5-Antikörpern oder Interleukin-5-Rezeptor-Antikörpern zeigen erste vielversprechende Ergebnisse, weitere Therapieansätze (z.B. ein zielgerichteter Antikörper gegen das eosinophilen-spezifische

Oberflächenmolekül Siglec 8 (engl. *sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin 8*) sind im Fokus aktueller Forschung.

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass dysregulierter Zelltod auch bei Patient*innen mit Hypereosinophilie eine zentrale Rolle spielt [13]. Die Unfähigkeit einer Zelle in den biologisch geplanten Zelltod überzugehen ist eine der sog. „*Hallmarks of Cancer*“ (engl. Merkmale von Krebs) [14] und die Überwindung dieser Apoptoseresistenz ist ein vielversprechendes und zum Teil schon etabliertes Therapiekonzept in der modernen Hämatonkologie [15]. Physiologischerweise wird der intrinsische Apoptosemechanismus streng durch die Interaktion zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen, den Proteinen der BCL-2-Familie (BCL-2: engl. *B-cell lymphoma 2*), gesteuert [16]. Für einige hämatologische Neoplasien, wie z.B. beim Follikulären Lymphom oder der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL), ist bereits nachgewiesen, dass eine Dysbalance zwischen den pro- und apoptotischen BCL-2-Proteinen maßgeblich zur Pathogenese beiträgt [17, 18]. Mittels neu entwickelter „*small molecules*“ (engl. kleine Moleküle), den BH3-Mimetika (BH3: engl. *BCL-2 homology domain 3*), konnte genau dieses Ungleichgewicht in der jüngsten Vergangenheit molekular adressiert werden. Das erste zugelassene Therapeutikum für eine zielgerichtete Therapie dieser Art, Venetoclax (auch ABT-199; Handelsname *Venclyxto*®), ist aktuell bereits für die Behandlung von Chronisch Lymphatischer Leukämie (CLL) und Akuter Myeloischer Leukämie (AML) zugelassen [18]. Weitere Medikamente mit ähnlichem Wirkprinzip befinden sich aktuell noch in *in vitro* Entwicklung oder in klinischen Studien [18-20].

Ziel dieser Dissertation war es, eosinophile Granulozyten von Patient*innen mit Hypereosinophilie mit Eosinophilen von gesunden Spender*innen hinsichtlich ihres Apoptoseverhaltens zu untersuchen. Dabei wurden vor allem die Expressionslevel zentraler BCL-2-Proteine direkt miteinander vergleichen und das Verhalten auf Apoptoseinduktion mittels BH3-Mimetika *in vitro* analysiert. Zudem wurden myeloide Progenitorzellen aus Patientenmaterial und aus gesundem Spendermaterial auf ihr *in vitro* Ansprechen auf ebendiese zielgerichtete Therapie untersucht.

1.1. Hypereosinophilie als multiformes Krankheitsbild

1.1.1. Definition und Epidemiologie von Hypereosinophilie und hypereosinophilieassoziierten Erkrankungen

Eosinophilie ist durch eine erhöhte Anzahl an Eosinophilen im peripheren Blut von über 3-5% der Leukozytenzahl bzw. einer korrespondierenden absoluten Eosinophilenzahl (AEC, engl. *absolute eosinophil count*) von über $0,35-0,5 \times 10^9 / L$ definiert. Dabei wird

weiter unterschieden in (1) milde Eosinophilie bei AEC bis $1,5 \times 10^9 / L$, (2) moderate Eosinophilie bei AEC von $1,5-5 \times 10^9 / L$ und (3) schwere Eosinophilie bei AEC $> 5,0 \times 10^9 / L$ [21]. Unter Hypereosinophilie versteht man eine Erhöhung der absoluten Eosinophilenzahl im peripheren Blut von $1,5 \times 10^9 / L$ [22].

Die Inzidenzen und Prävalenzen von Erkrankungen mit Hypereosinophilie sind nicht ausreichend beschrieben [5]. Laut Daten des *National Cancer Institute* der USA lag die altersangepasste Inzidenz für die Diagnose „Hypereosinophiles Syndrom“ in den 5 Jahren zwischen 2001 und 2005 bei 0.036 pro 100.000 [23]. Auch wenn die Diagnose in der Regel erst im Erwachsenenalter gestellt wird und die altersspezifische Inzidenz in der Gruppe der 60 bis 85 jährigen am höchsten ist [23], werden Einzelfälle im Kindesalter beschrieben [24, 25]. Der Anteil der Patient*innen mit der häufigsten genetischen Translokation *FIP1L1-PDGFR*A (*FIP1L1*: engl. *factor interacting with PAPOLA and CPSF1*) wird je nach Studie sehr heterogen von 3% bis 56% beziffert [26]. Nur bei etwa 5-20% der Patient*innen mit persistierender Eosinophilie kann eine Klonalität im Sinne von Fusionsgenen, zytogenetischen Aberrationen oder Mutationen bewiesen werden [27, 28]. Aufgrund neuer Diagnostikmöglichkeiten, neu beschriebener Krankheitsentitäten und nicht zuletzt auch durch das Überlappen der hypereosinophilieassoziierten hämatologischen Erkrankungen und der ANCA-negativen EGPA [29], sind aktuell kaum weitere zuverlässige epidemiologische Daten zugänglich.

1.1.2. Klinische Manifestationen von Hypereosinophilie

Genauso heterogen wie die Ursachen von Eosinophilie (siehe **Kapitel 1.1.3**), präsentiert sich auch die klinische Symptomatik. Zu Organschäden und Gewebeeinfiltration durch eosinophile Granulozyten kann es dabei bei jedem Erkrankungssubtyp kommen [5]. Die häufigsten Symptome sind dabei Fatigue (26%), Husten (24%), Dyspnoe (16%), Angioödem oder Myalgien (14%), Fieber (12%) und Rhinitis (10%) [30]. Praktisch alle Organsysteme des menschlichen Körpers können in Mitleidenschaft gezogen werden [7-12, 31] (**Tabelle 1**).

Patient*innen mit nur milder Eosinophilie und ohne Zeichen einer Organmanifestation können vorerst beobachtet werden, eine weiterführende Diagnostik sollte aber bei Anstieg der Eosinophilenzahl erfolgen [32]. Es ist schwierig vorherzusagen, welche Dauer und Schwere der Eosinophilie bei einzelnen Patient*innen zu Gewebeschäden führen wird [5]. Es liegen nur unzureichende Daten vor, um den Beginn der Therapie auf der Grundlage einer bestimmten Eosinophilenzahl in Abwesenheit einer Organmanifestation zu stützen. Eine absolute Eosinophilenzahl von $1,5-2,0 \times 10^9 / L$ wurde jedoch von einigen als Schwellenwert für den Beginn einer Behandlung empfohlen [33].

Organsystem	Kumulative Frequenz aus 3 Studien, in %	Beispiele organspezifischer Krankheitsmanifestationen
Hämatologisches System	100	Leukozytose mit Eosinophilie; Neutrophilie, Basophilie, Myeloide Unreife, unreife und/oder dysplastische Eosinophile; Anämie, Thrombozytopenie oder Thrombozytose, erhöhte Knochenmarkblasten, Myelofibrose
Kardiovaskuläres System	58	Kardiomyopathie, konstriktive Perikarditis, Endomyokarditis, Wandthromben, Herzklappendysfunktion, Endomyokardfibrose, Myokardinfarkt
Haut	56	Angioödem, Urtikaria, Papeln/Nodula, Plaques, aquagener Pruritus, Erythroderm, Mukosaulcera, bullöse Läsionen, Mikrothromen, Vaskulitis, Wells-Syndrom
Neurologisches System	54	Thrombembolien, periphere Neuropathie, Enzephalopathie, Demenz, Epilepsie, Kleinhirndegeneration, eosinophile Meningitis
Lunge	49	Lungeninfiltrate, Effusionen, Fibrose, Emboli, milchglasartige Knoten, Akutes Lungenversagen (ARDS)
Milz	43	Splenomegalie, Milzinfarkte
Leber / Gallenblase	30	Hepatomegalie, Fokalläsionen, Chronische Hepatitis, Lebernekrosen, Budd-Chiari-Syndrom, Sklerosierende Cholangitis, Cholezystitis, Cholestase
Auge	23	Mikrothromen, Choroidalinfarkte, Retinale Arteriitis, Episkleritis, Keratoconjunctivitis sicca, Adie Syndrom (Pupillotonie)
Gastrointestinales System	23	Aszites, Diarrhö, Gastritis, Kolitis, Pankreatitis
Muskuloskelettales System	N/A	Arthritis, Bursitis, Synovitis, Raynaud-Phänomen, Fingernekrosen, Polymyositis/Myopathien
Niere	N/A	Akutes Nierenversagen mit Charcot-Leyden Kristallurie, Nephrotisches Syndrom, Immunotaktoide Glomerulonephritis, Rasch progressive Glomerulonephritis

Tabelle 1: Klinische Manifestationen bei Hypereosinophilie (*Organ involvement in hypereosinophilic syndrome*), modifiziert und übersetzt nach Gotlib et al. 2004 [31].

1.1.3. Klassifikationssystem der Hypereosinophilen Syndrome nach WHO 2019

Aufgrund der Beschreibung der Fusionsgene mit *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* (engl. *fibroblast growth factor receptor 1*) und dem Fusionsgen *PCM1-JAK2* (engl. *pericentriolar material 1*; Januskinase 2) und ihre Rolle bei Hypereosinophilie wurde die Einteilung der Hypereosinophilien durch die *World Health Organization* (WHO; engl. für Weltgesundheitsorganisation) 2008 [34] und 2016 überarbeitet [35]. Die für diese Arbeit verwendete Nomenklatur bezieht sich auf das aktuellste WHO Update von 2019 von Shomali et al.

[5] und die aktuelle DGHO (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie) Leitlinie von November 2020 [27].

Eosinophilien sind eine sehr heterogene Krankheitsgruppe aus hämatologischen und nichthämatologischen Diagnosen. Ein strukturiertes diagnostisches Vorgehen ist deshalb zwingend notwendig (**Abbildung 1** und **Abbildung 2**). Nach Ausschluss einer reaktiven Eosinophilie und bei Vorliegen einer persistierenden und signifikanten Eosinophilie, eines hyperzellulären Knochenmarks und einer Splenomegalie wird zunächst bis zur genaueren molekularen Charakterisierung der Begriff „myeloische Neoplasie mit Eosinophilie“ verwendet [27]. Wenn direkt durch PCR (Polymerasekettenreaktion), FISH Analyse (Fluoreszenz in-situ Hybridisierung) und/oder konventioneller Zytogenetik ein Fusionsgen unter der Beteiligung der Tyrosinkinase *PDGFRA* (z.B. *FIP1L1-PDGFRA*), *PDGFRB* (z.B. *ETV6-PDGFRB*, *ETV6*: engl. *ETS variant transcription factor 6*), *FGFR1* (z.B. *ZMYM2-FGFR1*, *ZMYM2*: engl. *Zinc finger MYM-type protein 2*) oder ein *PCM1-JAK2* Fusionsgen nachgewiesen werden kann, kann eine myeloische/lymphatische Neoplasie mit Eosinophilie (MLN-Eo) diagnostiziert werden [5, 27]. Die Diagnose Chronische Eosinophilienleukämie (CEL-NOS) darf gestellt werden, wenn eine Vermehrung von Blasten nachweisbar ist, in der Molekulargenetik klonale Marker gefunden werden oder zytogenetische Aberrationen (z.B. Deletion, komplexer Karyotyp) nachgewiesen sind [27]. Des Weiteren können auch andere durch die WHO-definierte myeloische Neoplasien (z.B. Chronisch Myeloische Leukämie (CML), Systemische Mastozytose (SM)) oder auch Punktmutationen, die mit keinem eindeutigen morphologischen Phänotyp einhergehen (z.B. *STAT5B N642H*, engl. *signal transducer and activator of transcription 5B*; *ASXL1*, engl. *additional sex combs like 1*), mit Hypereosinophilie assoziiert sein. Die WHO definiert zudem noch die sogenannte *Lymphocyte-variant Hypereosinophilia* (engl. lymphozytenabhängige Hypereosinophilie), die aufgrund eines abnormalen T-Zell-Phänotyps und dessen Rearrangement im T-Zell-Rezeptorgen entsteht [5]. Diese ist in der aktuellen DGHO Leitlinie von 2020 nicht aufgeführt [27]. Unter die Diagnose Hypereosinophiles Syndrom (HES) fallen schlussendlich alle Formen der Hypereosinophilie, die nicht die o.g. Kriterien erfüllen aber eine Organmanifestation aufweisen [5, 27]. Hypereosinophilie ohne Organmanifestation definiert die WHO Klassifikation als idiopathische Hypereosinophilie, in der Literatur und auch in der deutschen DGHO Leitlinie von 2020 wird in diesem Fall oft uneinheitlich von Hypereosinophilie unklarer Signifikanz (HE_{US}) gesprochen [5, 27].

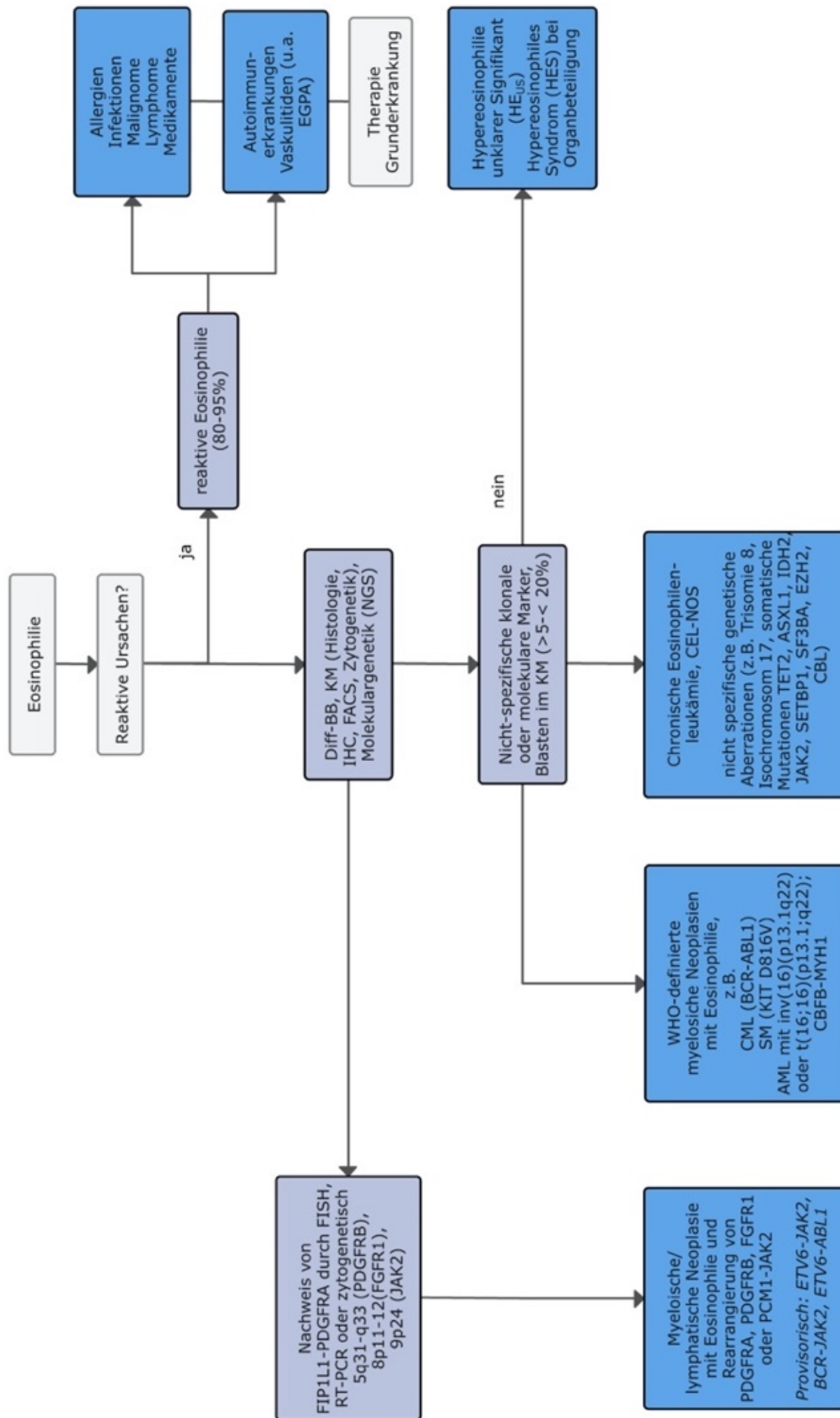
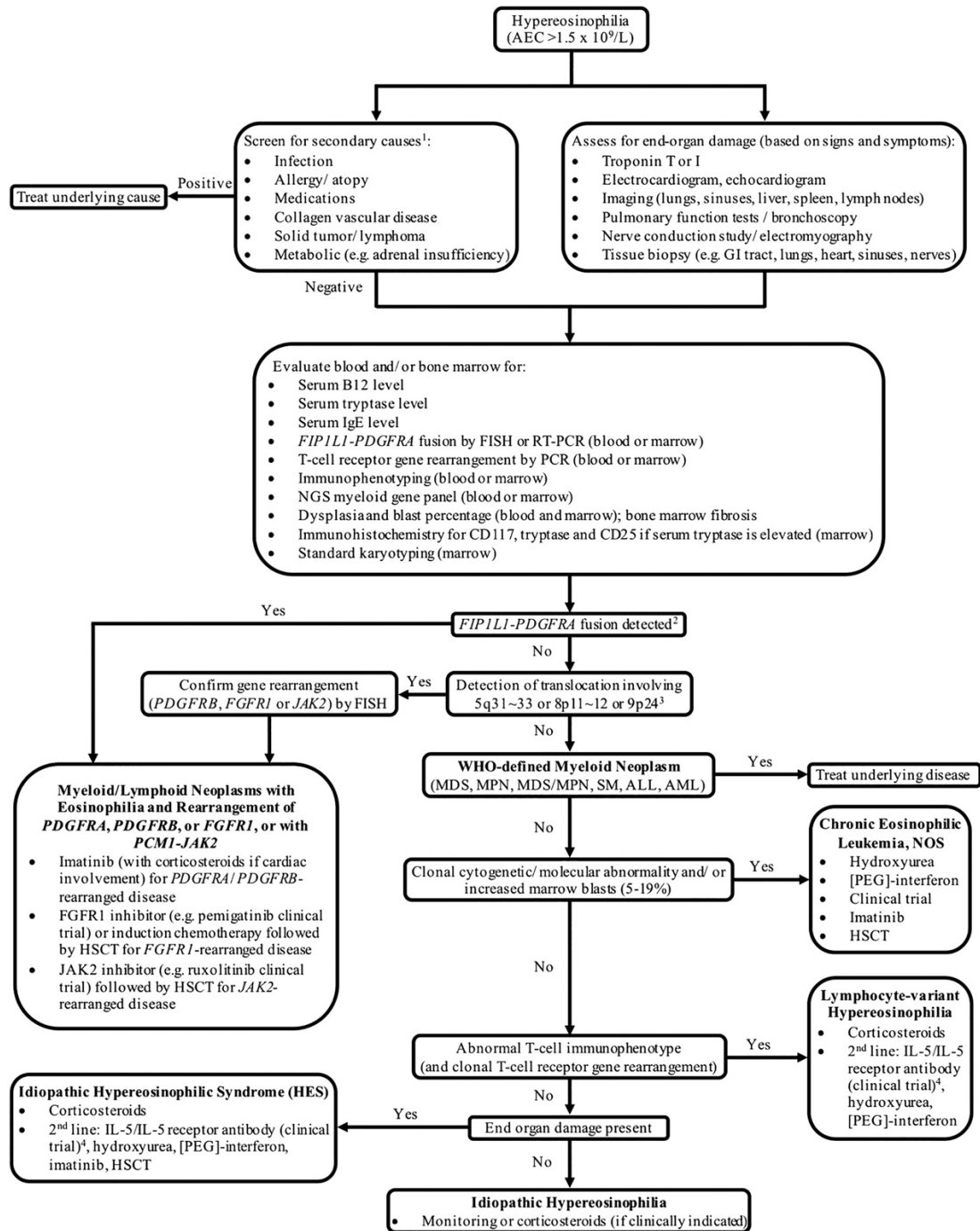


Abbildung 1: Differenzialdiagnostik und Subklassifikation der myeloischen Neoplasien mit Eosinophilie aus „Myeloische Neoplasien mit Eosinophilie“ (DGHO Leitlinie 2020) [27]. Diff-BB= Differenzialblutbild, KM = Knochenmark, IHC = Immunhistochemie, FACS = *Fluorescence activated cell sorting* (engl. Durchflusszytometrie), NGS = *Next Generation Sequencing* (Gensequenzierung), FISH = Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung, RT-PCR = Echtzeit-Polymerasekettenreaktion.



¹Including rare conditions (e.g. familial, hyper IgE syndrome, Omenn syndrome, episodic angioedema with eosinophilia, eosinophilia-myalgia syndrome)
²Alternative *PDGFRB* fusion genes can be inferred by cytogenetically visible translocations involving 4q12
³Translocations involving 13q12 (*FLT3* gene) are associated with eosinophilic neoplasms and have not been formally included in the WHO classification
⁴Mepolizumab or Benralizumab

Abbildung 2: Diagnosealgorithmus des WHO Updates 2019 von Shomali et al. [5] (originaler Abdruck auf englisch), basierend auf der revidierten WHO Klassifikation von Hypereosinophilen Syndromen von 2016.

1.1.3.1. Reaktive Hypereosinophilie

In der Hypereosinophiliediagnostik ist der erste wichtige Schritt, reaktive Eosinophilien auszuschließen (Abbildung 1 und Abbildung 2). Diese können durch endokrinologische Erkrankungen, Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, Hauterkrankungen, Herz-erkrankungen, Lungenerkrankungen, Neoplasien, rheumatische Erkrankungen und

Infektionen hervorgerufen werden [32]. Eine erste Wahrscheinlichkeitsabschätzung der möglichen Differenzialdiagnose kann auch bereits anhand der Eosinophilie vorgenommen werden [32]. Während allergische Reaktionen, die meisten Autoimmunerkrankungen und chronische Infektionen meist nur zu milder bis moderater Eosinophilie führen, können vor allem die myeloproliferativen Erkrankungen, die EGPA und invasive Parasitosen (v.a. durch Ascariasis, Strongyloidiasis, Toxocara und Hakenwürmer) eine schwere Eosinophilie hervorrufen [32]. Hauptgrund einer sekundären Eosinophilie sind in Deutschland vor allem Arzneimittelnebenwirkungen und allergische Reaktionen, weltweit sind vor allem Wurminfektionen führend [32]. Eine Therapie erfolgt ursachenorientiert je nach Diagnose [5]. Ausführungen zur EGPA als Ursache sekundärer Eosinophilie sind im entsprechenden **Kapitel 1.1.4** nachzulesen.

1.1.3.2. WHO-definierte myeloische Neoplasien mit Eosinophilie (MPN-Eo)

Sobald sekundäre Ursachen für Eosinophilie ausgeschlossen wurden, sollte die Diagnostik mit dem Fokus auf eine primäre Knochenmarksstörung fortgesetzt werden (**Abbildung 1** und **Abbildung 2**). Eine differenzierte Analyse des Blutes (z.B. auf Blasten, dysplastische Zellen, Monozytose, erhöhter Vitamin B-12- oder Trypsasespiegel) sowie eine morphologische, zytogenetische und molekulare Analyse des Knochenmarks kann helfen, eine WHO-definierte myeloische Neoplasie mit Eosinophilie zu identifizieren [5]. Hierzu gehören beispielsweise die SM (*KIT D816V* Mutation), die CML (z.B. *BCR-ABL* Translokation; *BCR*: engl. *breakpoint cluster region*, *ABL*: engl. *abelson kinase*), die AML (v.a. die historischen Subtypen M2 und M4 nach FAB mit Translokationen im *Core Binding Factor*; *FAB*: engl. *French-American-British*), das Myelodysplastische Syndrom (MDS) und MDS/MPN-Overlap-Syndrome (z.B. Chronisch Myelomonozytäre Leukämie (CMML)) [5]. Zum Teil wird für diese Subgruppe auch der Begriff Myeloproliferative Neoplasie mit Eosinophilie (MPN-Eo) verwendet, dieser erscheint allerdings nicht in der offiziellen WHO Leitlinie [5]. Bei den myeloproliferativen Formen der Hypereosinophilie kommt es aufgrund von erhöhter Haptocorinproduktion häufig zu pathologisch erhöhten Vitamin-B12-Spiegeln im Serum [36]. Generell scheint eine erkrankungsassoziierte Eosinophilie die Prognosen der Grunderkrankung jeweils zu verschlechtern und eine Transformation, z.B. in eine sekundäre Leukämie zu begünstigen [5]. Eine Therapie erfolgt ursachenorientiert je nach Hauptdiagnose [5].

1.1.3.3. Myeloische/lymphatische Neoplasien mit Eosinophilie und Rearrangement von *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* oder *PCM1-JAK2* (MLN-Eo)

PDGFRA

Weitergehende Laboranalysen sollten bei primärer Eosinophilie und hochgradigem Verdacht auf eine hämatologische Erkrankung mit dem Screening des peripheren Blutes auf die Genfusion *FIP1L1-PDGFRA*, z.B. mittels FISH (indirekt; Nachweis der Deletion des *CHIC2*-Gens (*CHIC2*: engl. *cysteine-rich hydrophobic domain-containing protein 2*), das zwischen *FIP1L1* und *PDGFRA* liegt) oder RT-PCR (direkter Nachweis des Fusionsgens; RT-PCR: Echtzeit-PCR), beginnen [5, 37]. Es ist nach *BCR-ABL1* (bei CML) das häufigste Tyrosinkinasefusionsgen, entsteht durch eine zytogenetisch kryptische, interstitielle Deletion von etwa 800 kb auf der Chromosomenbande 4q12 und ist bei nahezu über 95% der Patient*innen mit einer Eosinophilie assoziiert [27]. Die Mehrheit der Krankheitsfälle wird in einer chronischen Phase der myeloproliferativen Neoplasie diagnostiziert, nur eine Minderheit in einer myeloischen oder lymphatischen Blastenphase [27, 38]. Das Verhältnis von Männern zu Frauen, bei denen das Fusionsgen nachweisbar ist, liegt aus nicht bekannten Gründen bei 9 zu 1 [31]. Neben *FIP1L1* sind auch *PDGFRA*-Fusionsgene mit *BCR*, *ETV6* oder *CDK5RAP1* (engl. *CDK5 regulatory subunit-associated protein 1*) beschrieben [39], zudem wurden auch bereits zu Eosinophilie führende Punktmutationen im *PDGFRA*-Gen selbst entdeckt [40]. Wenn in Einzelfällen kein Screening auf das Fusionsgen *FIP1L1-PDGFRA* verfügbar ist, sollte die Serumtryptase als Ersatzmarker bestimmt werden. Es wird diskutiert, dass anhand erhöhter Tryptase-Spiegel die MLN-Eo von MPN-Eo-Varianten abgegrenzt werden kann [41]. Interessanterweise wurde die *FIP1L1-PDGFRA* auch in Fällen identifiziert, in denen im Knochenmark erhöhte Mastzellzahlen zusammen mit einer peripheren Eosinophilie aufgefallen sind [28]. Allerdings zeigt das Knochenmark dieser Patient*innen eher lose Mastzellcluster im Gegensatz zu Patient*innen mit klassischer SM (dichte Mastzellaggregate bei *KIT D816V* Mutation) [28]. Für die *PDGFRA*-assoziierte Eosinophilie konnte der therapeutische Nutzen des Tyrosinkinaseinhibitors (TKI) Imatinib zunächst empirisch und anschließend in multiplen klinischen Studien belegt werden [31, 37]. Aktuelle Leitlinien empfehlen eine Anwendung von 100-400mg täglich für ein langanhaltendes molekulares Therapieansprechen, ein Absetzen der Therapie kann zum Rezidiv führen [5]. Im Vergleich zur CML konnten in den letzten zehn Jahren nur wenige erworbene Imatinibresistenzen bei *PDGFRA* positiver Hypereosinophilie beobachtet werden [5]. Auch in Abwesenheit der in **Kapitel 1.1.2** genannten möglichen Organmanifestationen [5] ist aufgrund des guten Therapieansprechens eine Behandlung immer indiziert, nicht zuletzt um auch Gewebeschäden durch Eosinophileninfiltration proaktiv zu vermeiden [5].

PDGFRB

Bei Abwesenheit von Aberrationen im *PDGFRA*-Gen sollten weitere molekulare Aberrationen als Auslöser für die primäre Hypereosinophilie in Betracht gezogen werden. Bereits der Karyotyp in der zytogenetischen Untersuchung kann Hinweise auf Fusionsgene liefern. So sind Translokationen mit 5q31 ~ 33 ein Hinweis auf ein *PDGFRB*-Fusionsgen und Translokationen mit 8p11 ~ 12 ein Hinweis auf eine Fusion mit dem *FGFR1*-Gen [42]. Bei einem solch auffälligen Karyotyp sollte unmittelbar eine FISH-Analyse zum Nachweis eines Rearrangements und eine RT-PCR/FISH-Analyse zum Nachweis des Fusionsgens folgen [43]. Alleine für *PDGFRB* sind derzeit über 30 verschiedene Fusionspartner bekannt, die häufigsten davon sind *ETV6-PDGFRB* und *CCDC88C-PDGFRB* (*CCDC88C*: engl. *coiled-coil domain containing 88C*) [39]. In seltenen Fällen sind Umlagerungen von *PDGFRB* kryptisch und können nur durch RT-PCR oder RNA-Sequenzierung nachgewiesen werden [44]. Im Gegensatz zum *FIP1L1-PDGFRB*-Fusionsgen, gehen Umlagerungen von *PDGFRB* und/oder *FGFR1* nicht immer mit Hypereosinophilie einher [43]. Das Knochenmark zeigt sich morphologisch wie auch bei *FIP1L1-PDGFRB* hyperzellulär, allerdings sind hier einige Fälle einer primären Blastenphase bekannt [27]. Zudem liegt bei 30% der Patient*innen im peripheren Blut eine Monozytose von > 1000/µl vor, woraufhin häufig eine CMML oder eine Juvenile Myelomonozytäre Leukämie (JMML) diagnostiziert wird [27, 43]. Umgekehrt kann bei ca. 1% der Patient*innen mit zytogenetisch definierter CMML, atypischer CML, JMML oder MDS/MPN-Overlap-Syndrom ein *PDGFRB*-Rearrangement diagnostiziert werden [45]. Gerade im Hinblick auf das exzellente Ansprechen der *PDGFRB*-Fusionsgene auf den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib ist eine Identifikation der genetischen Aberration wichtig [39, 43].

FGFR1 und PCM1-JAK2

Myeloische Neoplasien mit Eosinophilie, an denen *FGFR1* beteiligt ist (frühere Bezeichnung: 8p11 myeloproliferatives Syndrom), sind ähnlich selten [5, 35, 46]. Seit der Entdeckung des *ZNF198-FGFR1*-Fusionsgens (*ZNF198*: engl. *zinc finger protein 198*) im Jahr 1998 wurden 14 Fusionsgene identifiziert [39]. Die Patient*innen werden häufig bereits mit einer primärer Blastenphase oder einem raschen Übergang in eine sekundäre Blastenphase (myeloisch oder lymphatisch, zum Teil auch extramedullär) auffällig [27]. Der natürliche Verlauf der MLN-Eo mit *FGFR1*-Rearrangement endet normalerweise binnen ein bis zwei Jahren in einer sekundären AML oder T-ALL (T-akute lymphoblastische Leukämie) [35]. Einzige Heilungschancen bestehen aktuell mit einer Hochdosischemotherapie gefolgt von einer allogenen Stammzelltransplantation. Der TKI Ponatinib konnte in einzelnen Fällen erfolgreich eingesetzt werden [47] und der TKI Midostaurin konnte im murinen Modell die konstitutiv aktivierte *ZNF198-FGFR1* Fusion inhibieren. Aktuell

wird der *FGFR1*-, -2- und -3-Inhibitor Pemigatinib für *FGFR1*-assoziierte hämatologische Neoplasien untersucht (clinicaltrials.gov, NCT03011372). Erste Ergebnisse scheinen mit einer Gesamtansprechrates von 85% vielversprechend [48], die Studie ist noch nicht abgeschlossen (Stand 11/2021).

Das Fusionsgen *PCM1-JAK2* wurde provisorisch als Entität in die aktuelle WHO-Klassifikation integriert, da es den MLN-Eo mit *PDGFRA/B* und *FGFR1* Fusionsgenen sehr stark ähnelt [5]. Therapie der Wahl ist wie bei Aberrationen im *FGFR1*-Gen die Hochdosischemotherapie gefolgt von einer allogenen Stammzelltransplantation, JAK2-Inhibitoren wie beispielsweise Ruxolitinib wurden in Einzelfällen erfolgreich eingesetzt [49, 50].

1.1.3.4. Chronische Eosinophilenleukämie, nicht weiter klassifiziert (CEL-NOS)

Nach Ausschluss der in **Kapitel 1.1.3.2** und **Kapitel 1.1.3.3** definierten myeloproliferativen Erkrankungen sollte bei Vorliegen von zytogenetischen, molekularen und/oder morphologischen Hinweisen auf eine eosinophile myeloische Malignität, die ansonsten nicht klassifizierbar ist, die Diagnose CEL-NOS gestellt werden [5, 27, 34]. Im Gegensatz zum Hypereosinophilen Syndrom (HES; siehe **Kapitel 1.1.3.6**) zeichnet sich die CEL-NOS durch das Vorhandensein von zytogenetischen und molekularen Anomalitäten oder erhöhten Blasten (>2% im peripheren Blut bzw. >5% im Knochenmark, aber <20% Blasten in beiden Kompartimenten) aus [5, 27, 34]. Mutationen, die mithilfe von NGS-Panels (NGS: engl. *New Generation Sequencing*) gefunden werden, sollten aber immer differenziert betrachtet und auf ihren Zusammenhang mit der eosinophilen Neoplasie überprüft werden [5]. Die Prognose der CEL-NOS ist mit einem medianen Überleben von 22,2 Monaten sehr schlecht, das Risiko einer Transformation in eine akute Leukämie ist sehr hoch und das Therapieansprechen auf Zytostatika ist enttäuschend [51]. Es erfolgt die Zytoreduktion mittels Hydroxyurea und Interferon, einzige kurative Therapie ist die allogene Stammzelltransplantation [5]. In Einzelfällen erwies sich eine Behandlung mit Imatinib als erfolgreich, was wahrscheinlich auf eine nicht diagnostizierte Aberration in *PDGFRA/B* zurückzuführen war [51].

1.1.3.5. Lymphocyte-variant Hypereosinophilie (L-HES)

Hypereosinophilie kann auch aufgrund der Expansion eines zytokinproduzierenden T-Zellklons entstehen, wobei es zu einem Zusammenspiel von klonalen und reaktiven Prozessen kommt [34]. Die L-HES ist klonal in Bezug auf die Produktion von aberranten T-Lymphozyten, die Eosinophilie resultiert aus der von den T-Zellen produzierten eosinophilenstimulierenden Wachstumsfaktoren [34]. Meist ist die Überproduktion von Interleukin-5 (IL5) durch T-Zellen für die Hypereosinophilie in Blut und im Gewebe verantwortlich, während die abnormale T-Zell-Population in der Regel asymptomatisch ist [52]. Nur

selten entwickeln sich T-Zell-Lymphome, der Krankheitsverlauf ist sonst als indolent einzustufen [53]. Der Immunphänotyp dieser Lymphozyten umfasst doppelt negative, unreife T-Lymphozyten (z.B. CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻; CD: engl. *cluster of differentiation*) oder T-Lymphozyten ohne CD3-Expression (z.B. CD3⁻ CD4⁺) [54]. Weitere immunphänotypische Anomalien sind eine hohe CD5-Expression auf CD3⁻ CD4⁺ T-Zellen, der Verlust von CD7 oder die Expression von CD27.57 [5, 52]. Schätzungsweise ist diese Variante bei 17 bis 27% der Patient*innen mit ungeklärter Eosinophilie oder HES vorhanden, trotz Fehlen einer signifikanten Lymphozytose [55]. Konsenskriterien für die Diagnose einer L-HES sind nicht definiert [5]. Eine diagnostizierte T-Zell-Klonalität mittels PCR ohne weitere T-Zell-Anomalien oder der Nachweis einer erhöhten Zytokinproduktion sind für die Diagnose L-HES nicht ausreichend [5]. Therapeutika der Wahl sind bei diesem Subtyp der Hypereosinophilie Corticosteroide [5].

1.1.3.6. Hypereosinophiles Syndrom (HES)

Falls keine der in den Kapiteln zuvor definierten Krankheitsentitäten (**Kapitel 1.1.3.1; 1.1.3.2; 1.1.3.3; 1.1.3.4 und 1.1.3.5**) eindeutig diagnostiziert werden kann, darf im Falle einer Organmanifestation bzw. klinischen Symptomen die Diagnose Hypereosinophiles Syndrom (HES) gestellt werden [5, 27]. Gerade aber durch die neue technische Verfügbarkeit von genetischen Sequenzierungen wird erwartet, dass in Zukunft die Diagnose HES aufgrund der Identifikation neuer Mutationen in den Hintergrund rückt und Patient*innen immer mehr unter die Kategorie CEL-NOS fallen werden [5]. Analysen aus dem Deutschen Register für Erkrankungen der Eosinophilen und Mastzellen identifizierten bei 3 bis 4% der Patient*innen eine *KIT D816V* oder *JAK2 V617F* Mutation [56]. In einer weiteren Studie zeigten Patient*innen mit ursprünglich diagnostiziertem HES letztendlich Aberrationen (14 der 51 Patient*innen) in den Genen *ASXL1* (43%), *TET2* (36%; engl. *tet methylcytosine dioxygenase 2*), *EZH2* (29%; engl. *enhancer of zeste homolog 2*), *SETBP1* (22%; engl. *SET binding protein 1*), *CBL* (14%; engl. *casitas b-lineage lymphoma*) und *NOTCH1* (14%; engl. *notch homolog 1, translocation associated*) [57]. Patient*innen mit einer dieser nachgewiesenen Mutationen konnte eine schlechtere Prognose als HES-Patient*innen ohne Mutationsbefund nachgewiesen werden, vergleichbar mit der Prognose bei Patient*innen mit CEL-NOS [57]. Für Patient*innen mit definiertem HES sind Corticosteroide, welche eine rasche Verringerung der Eosinophilenzahl bewirken, das Therapeutikum der ersten Wahl [27]. Anzeichen einer Organschädigung oder eine weiterhin signifikante Erhöhung der Eosinophilenzahl unter einer Prednison dosis von >10mg sind Indikationen zur Therapieerweiterung mit anderen Substanzklassen [5]. Als First-Line-Erweiterung sollte dabei zuerst Hydroxyurea ergänzend zu Prednison eingesetzt werden [5]. Interferon- α kann bei HES-Patient*innen, die auf beide First-Line-

Therapien nicht ansprechen, hämatologische Remissionen hervorrufen oder als steroid-sparendes Therapeutikum für Personen mit hohen Prednison Dosen eingesetzt werden [5]. Zudem befinden sich derzeit monoklonale Antikörper gegen das eosinophilenstimulierende IL5 (Interleukin 5) und den IL5-Rezeptor in klinischen Studien (Stand November 2021). Mepolizumab ist ein vollständig humanisierter monoklonaler IgG-Antikörper, der die Bindung von IL5 an die Kette des auf Eosinophilen exprimierten IL5-Rezeptors hemmt und so ihr Überleben verringert [52]. Die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA, engl. US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel) hat das Therapeutikum im September 2020 für die Behandlung des HES zugelassen [58], nachdem klinische Studien einen großen therapeutischen Nutzen synergistisch mit Corticoidgabe erwiesen haben [59]. Eine Zulassung durch die *European Medicine Agency* (EMA, engl. Europäische Arzneimittel-Agentur) wurde 2020 vom Hersteller beantragt [60]. Mit Benralizumab ist ein Anti-IL5-Rezeptor-Antikörper verfügbar, der bereits bei Patient*innen mit schwerem, nichtkontrollierbarem Asthma eingesetzt wird [52]. Der monoklonale Antikörper wurde in einer Phase-II-Studie erfolgreich für Patient*innen mit HES getestet [61] und befindet sich aktuell in weiterer klinischer Testung (clinicaltrials.gov NCT04191304 und NCT02130882, Stand November 2021).

1.1.4. Differentialdiagnose Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA)

Aufgrund der fundamental unterschiedlichen Therapie ist eine klare differenzialdiagnostische Abgrenzung Eosinophilie-assoziiierter Autoimmunerkrankungen wie z.B. der EGPA von den HES notwendig [27]. Die EGPA wird nach der Chapel-Hill-Konsensus-Definition von 2012 als eosinophilenreiche und nekrotisierende granulomatöse Entzündung definiert, bei der eine Beteiligung der Atemwege häufig ist [62]. Die nekrotisierende Vaskulitis betrifft dabei vorwiegend kleine bis mittlere Gefäße und ist mit Asthma und Eosinophilie assoziiert [62]. Die EGPA unterscheidet sich von anderen ANCA-assoziierten Vaskulitiden durch das konstante Vorhandensein von Asthma, Blut- und Gewebeeosinophilie und die geringe Prävalenz von ANCA (nur bei 20-40% der Patient*innen) [63]. Oftmals erweist sich der histologische Nachweis einer EGPA aufgrund von möglichen Vortherapien mit z.B. Corticosteroiden oder auch Fehlern bei der Biopsie als erschwert [64]. EGPA-Patient*innen mit negativem ANCA-Status weisen zwar weniger vaskulitische Symptome (z.B. Purpura, periphere Neuropathie, Glomerulonephritis, Skleritis) auf, leiden aber häufiger unter einer Kardiomyopathie (ähnlich der bei HES) [65]. Die Ergebnisse einer negativen Studie, in der Azathioprin gegen Placebo in EGPA mit geringem Risiko getestet wurde [66] und die kürzlich durchgeführte MIRRA Studie, in der der Nutzen von Mepolizumab neben dem HES auch in der EGPA nachgewiesen wurde [67], weisen auf eine starke Überlappung von ANCA-negativer EGPA und dem HES hin. Die

klinischen und biologischen Profile der beiden Erkrankungen überschneiden sich deutlich [68, 69]. Diagnostische Sorgfalt ist von großer Bedeutung, um Fehldiagnosen und damit auch Fehltherapien zu vermeiden. Zwar sind für beide Erkrankungen Glucocorticoide Teil der Ersttherapie, die weitere Therapie der EGPA beinhaltet jedoch vor allem Methotrexat, Azathioprin, Cyclophosphamid und bei refraktärer Erkrankung Rituximab [64, 70].

1.2. Apoptoseresistenz als Merkmal maligner Zellen und therapeutische Möglichkeiten

1.2.1. Molekularbiologische Grundlagen der Apoptose

Molekularbiologisch sind verschiedene Formen von kontrolliertem und nichtkontrolliertem Zelltod beschrieben [71]. Apoptose ist eine hochkomplexe und gut regulierte Form des programmierten Zelltods [72]. Sie spielt eine wesentliche Rolle bei der Gewebeentwicklung, der Aufrechterhaltung der Homöostase und des Immunsystems [72]. Sowohl übermäßige als auch unzureichende Apoptose kann zu einer Vielzahl von pathologischen Zuständen führen, einschließlich neurodegenerativer Erkrankungen, immunologischer Störungen oder Malignomen [73]. Die erfolgreiche Vermeidung von Zelltod ist ein wichtiges Kennzeichen von Krebs und trägt zur Entwicklung klonaler Zellen, zum Tumorstromwachstum und zu Therapieresistenzen bei [14].

Charakteristisch für Apoptose ist dabei die Schrumpfung der Zelle, die Bildung von blasenförmigen Ausbuchtungen an der Zelloberfläche, die Kondensation und Degradierung von DNA, der Abbau der Mitochondrien, die Exposition des Phospholipids Phosphatidylserin an der Zelloberfläche und die Fragmentierung der Zelle in kleine membranumhüllte Teilstücke [74]. Diese Zellfragmente werden letztendlich von Makrophagen phagozytiert, ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen [74]. Dieses System ist so effektiv, dass selbst in Gewebe, das ein hohes Maß an physiologischer Apoptose aufweist (z.B. Thymusgewebe), mikroskopisch nur ein geringer Zelltod erkennbar ist [73].

Die Einleitung von Apoptose hängt maßgeblich von der Aktivierung einer Reihe von Cystein-Aspartat-Proteasen, den sogenannten Caspasen, ab [75]. Im Falle einer Zellschädigung werden die Initiatorcaspasen (Caspasen 8 und 9) aus inaktiven Caspasen aktiviert und lösen letztendlich über unterschiedliche Mechanismen eine Aktivierung weiterer Effektorcaspasen (Caspasen 3,6 und 7) aus, die die oben beschriebene Zelldegeneration einleiten [75].

1.2.1.1. Der extrinsische Apoptoseweg

Apoptose kann von einer Zelle selbst eingeleitet werden, wenn sie Schäden über eine Reihe von intrazellulären Mechanismen erkennt - ein Mechanismus, der als intrinsischer Weg bekannt ist [73]. Alternativ kann Apoptose auch durch externe Stimuli von beispielsweise Immunzellen ausgelöst werden - dies ist als extrinsischer Weg bekannt [73]. Dabei spielen sog. Todesrezeptoren, die durch Todesliganden natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) oder Makrophagen aktiviert werden, eine zentrale Rolle [75]. Todesrezeptoren sind Teil der Tumornekrosefaktor (TNF) Familie und umfassen viele Subtypen, wobei für jeden Todesrezeptor ein eigener Todesligand existiert [76]. Sobald ein Todesligand von extrazellulär an einen Todesrezeptor bindet, wird eine monomere Procaspase 8 auf der zytosolischen Seite des Rezeptors über ihre todesinduzierende Domäne (DED; engl. *death inducing domain*) in einem todesinduzierenden Signalkomplex (DISC; engl. *death-inducing signal complex*) gebunden [75]. Der DISC beinhaltet dabei die FAS-assoziierte Todesdomäne (FADD; engl. *FAS-associated death domain*) oder die TNF-Rezeptor-assoziierte Todesdomäne (TRADD; engl. *TNF receptor associated death domain*) als Adapterproteine, um die Interaktion mit Procaspase 8 zu verstärken [75]. Erst die Rekrutierung mehrerer Procaspase 8 Monomere zur DISC führt über Dimerisierung zur Aktivierung als Caspase 8 [75]. Diese kann, abhängig vom Zelltyp, über zwei verschiedene Wege Apoptose induzieren [75]. In sogenannten Typ-I-Zellen (z.B. Thymozyten, reife Lymphozyten) kann die aktivierte Initiatorcaspase 8 weitere Effektorcaspasen (Caspase 3, Caspase 6 und Caspase 7) rekrutieren und so direkt die Apoptose einleiten [71]. In Typ-II-Zellen (z.B. Hepatozyten, pankreatische β -Zellen und die meisten neoplastischen Zellen) hemmen inhibitorische Apoptoseproteine (IAP) diese Weiteraktivierung der Effektorcaspasen, es sei denn, die IAP werden selbst durch aus den Mitochondrien freigesetzte Proteine gehemmt [71]. Zudem kann Caspase 8 das BCL-2-Protein BID (engl. *BH3 interacting-domain death agonist*) proteolytisch zu tBID spalten, damit auch die (intrinsische) mitochondriale Apoptosekaskade aktivieren und das Apoptosesignal verstärken [71].

1.2.1.2. Der intrinsische Apoptoseweg

Der intrinsische Weg der Apoptose wird auch als der mitochondriale Apoptoseweg bezeichnet und kann durch eine Vielzahl an intrazellulären Stimuli (z.B. Hypoxie, DNA Schäden, reaktive Sauerstoffradikale) oder auch das Fehlen von überlebenswichtigen Faktoren (z.B. Zytokine, Hormone, Wachstumsfaktoren) ausgelöst werden [71]. Die Endstrecke des intrinsischen Apoptoseweges verläuft über die Aktivierung der Initiatorcaspase 9, welche analog zur extrinsischen Kaskade die Effektorcaspasen 3,6 und 7 aktiviert [77]. Diese Form der Apoptose wird primär durch Proteine der BCL-2-Familie

reguliert [77]. Sie fungieren dabei als Schalter zwischen Zellüberleben und Zelltod, in dem sie verschiedene proapoptotische und überlebensfördernde Signale integrieren [77]. Im Normalzustand befinden sich die BCL-2-Proteine im Gleichgewicht [78]. Sobald proapoptotische Signale überwiegen, können die proapoptotischen BCL-2-Proteine BAX (engl. *BCL-2-associated X protein*) und BAK (engl. *BCL-2 antagonist/killer*) die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP; engl. *mitochondrial outer membrane permeabilization*) sowie eine Störung des endoplasmatischen Retikulums und der Kernhülle initiieren [77]. Mitochondriale Proteine wie beispielsweise SMAC/DIABLO (engl. *second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low P*), OMI/HTRA2 (engl. *HtrA serine peptidase 2*), Endonuklease G oder Cytochrom c gelangen infolgedessen ins Zytosol [71]. Das zytosolische Cytochrom c bindet an den Peptidase-aktivierenden Faktor 1 (APAF-1; engl. *apoptotic protease activating factor 1*) und bildet unter konsekutiver Rekrutierung von Procaspase 9 den supramolekularen Komplex „Apoptosom“, der für die Aktivierung der Initiatorcaspase 9 verantwortlich ist [71]. Auch SMAC/DIABLO und OMI/HTRA2 wirken durch die Neutralisierung von IAP proapoptotisch [71].

1.2.1.3. Die BCL-2-Protein Familie

Die BCL-2-Proteine sind die zentralen Regulatoren der intrinsischen Apoptose. Über eine carboxyterminale hydrophobe Transmembrandomäne (TM) können sie auf intrazellulären Membranen, insbesondere auf der mitochondrialen Außenmembran, binden und wechselwirken [73]. Sie weisen in großen Teilen ihrer Sequenz Homologien auf, die als BH-Domänen (BH: engl. *BCL-2-Homology*) bekannt sind, und können aufgrund ihrer Struktur und Funktionalität grob in drei Gruppen eingeteilt werden (**Abbildung 3**) [73].

antiapoptotische BCL-2-Proteine

BCL-2, BCL-xL, BCL-w, MCL1, A1 und BCL-B

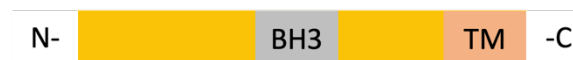


proapoptotische BCL-2-Proteine

BAK und BAX



BIK, BAD, BID, BIM, BMF, HRK, NOXA und PUMA



s

Abbildung 3: Übersicht über die Familie der BCL-2-Proteine und ihre Domänen, modifiziert nach Kaufmann et al. 2016 [79]. N = N-Terminus, C = C-Terminus, TM = Transmembrandomäne.

Eine überlebensfördernde Unterfamilie, bestehend aus BCL-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*), BCL-xL (engl. *B-cell lymphoma extra-large*), BCL-w (engl. *BCL-2-like protein 2*), MCL1 (engl. *myeloid cell leukemia 1*), A1 und BCL-B (engl. *BCL-2-like protein 10*), schützt dabei die Zellen, die diversen zelltoxischen Bedingungen ausgesetzt sind [77]. Während BCL-xL erst nach einem zytotoxischen Signal mit der äußeren Mitochondrienmembran fusioniert, ist BCL-2 als integrales Membranprotein ständiger Teil des Zellorganells [77]. Alle antiapoptotischen BCL-2-Proteine sind in der Lage, proapoptotische *BH3-only* Proteine und aktiviertes BAK/BAX zu binden und so eine MOMP (siehe **Kapitel 1.2.1.2**) zu verhindern [79].

Eine weitere Untergruppe bestehend aus BAX, BAK und BOK (engl. *BCL-2-related ovarian killer protein*), die sog. proapoptotischen BCL-2-bindenden Proteine, ist in ihrer molekularen Struktur dem BCL-2 sehr ähnlich [77]. Insbesondere BAX und BAK sind ihren überlebensfördernden Antagonisten in ihren Sequenzen für die BH1-, BH2- und BH3-Domäne (**Abbildung 3**) gleichartig [77]. BAK ist dabei, analog BCL-2, als integrales Membranprotein ein Teil der äußeren Mitochondrienmembran [73]. BAX liegt hingegen zytosolisch als Monomer vor und integriert nur nach Aktivierung in die äußere Mitochondrienmembran [73]. Im Ruhezustand sind beide Proteine durch IAP neutralisiert [73]. Zytotoxische Signale bewirken eine Konformationsänderung der beiden Proteine, erst als membranassoziierte Homooligomere können sie eine MOMP einleiten [73].

Die dritte Subgruppe (engl. *BH3-only* Proteine) umfasst die proapoptotischen Proteine BIK (engl. *BCL-2-interacting killer*), BAD (engl. *BCL-2 antagonist of cell death*), BID, BIM (engl. *BCL-2-interacting mediator of cell death*), BMF (engl. *BCL-2-modifying factor*), HRK (engl. *Harakiri*), NOXA (engl. *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*) und PUMA (engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*), die sich in ihrer Sequenz bis auf eine vorhandene BH3-Domäne deutlich von den anderen Mitgliedern der BCL-2-Familie unterscheiden [77]. Bei erhöhtem Level verdrängen sie kompetitiv neutralisierende IAPs aus ihrer Bindung mit BAX/BAK und ebnet so den Weg zur MOMP. Aktuelle Daten zeigen jedoch, dass *BH3-only* Proteine möglicherweise BAK und BAX auch direkt aktivieren können [73]. Bewiesen ist, dass die *BH3-only* Proteine BIM, PUMA und tBID alle proapoptotischen Proteine direkt neutralisieren, BAD selektiv BCL-2, BCL-xL und BCL-w antagonisiert, und NOXA lediglich MCL1 und A1 inhibiert (**Abbildung 4**) [77].

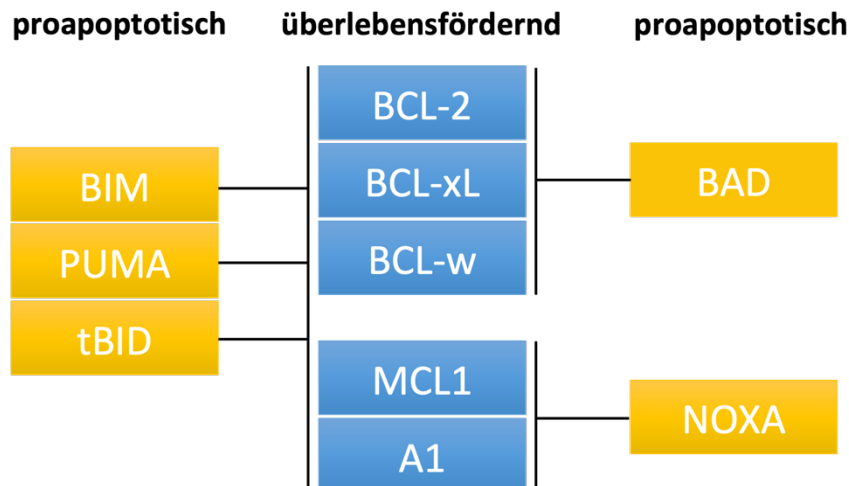


Abbildung 4: Die wichtigsten proapoptotischen und überlebensfördernden Proteine in der Übersicht, modifiziert nach Adams und Cory 2007 [77].

1.2.2. Deregulation von BCL-2-Proteinen in malignen Zellen und Modulation von Zelltodmechanismen als Therapieoption

Ein Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellproliferation ist für eine effektive Hämatopoese und Immunregulation von entscheidender Bedeutung, insbesondere für Zellen mit kurzer Lebensdauer [72]. Die Unfähigkeit einer Zelle in den biologisch geplanten Zelltod überzugehen ist eine der sog. „*Hallmarks of Cancer*“ [14] (engl. Merkmale von Krebs). Für diverse Krebsarten wurde bereits gezeigt, dass hohe Konzentrationen an antiapoptotischen Proteinen wie BCL-2 und BCL-xL nicht nur zur Tumorgenese und -progress, sondern auch zu einem mangelnden Ansprechen auf Chemotherapie beitragen [80]. Ähnliche Entdeckungen wurden in jüngster Vergangenheit für das antiapoptotische Protein MCL1 gemacht [81]. Auch der Verlust einiger Mitglieder der proapoptotischen BCL-2-Familie, insbesondere BIM, PUMA, BAD, BMF und BAX, kann Tumorentstehung beschleunigen [73]. Durch den Apoptoseblock und die somit prolongierte Überlebenszeit der aberranten Zellen steigt zudem das Risiko für den Erwerb weiterer onkogener Eigenschaften (z.B. Mutationen) [73].

Speziell in hämatologischen Neoplasien wie dem Follikulären Lymphom, der CLL, dem Mantelzelllymphom und Morbus Waldenström können erhöhte BCL-2-Spiegel beobachtet werden [80]. Dieses erhöhte Proteinexpressionsniveau kann auf verschiedene Mechanismen beruhen, einschließlich chromosomaler Translokationen (z.B. t(14;18)), Genamplifikationen (z.B. Amplifikation von BCL-2) und Herunterregulierung von Genen, die am BCL-2 RNA-Abbau beteiligt sind [82]. Bei der CLL, der häufigsten Leukämie beim Menschen, ist die Überexpression von BCL-2 beispielsweise auf den Verlust der Repression durch die microRNAs miR-15a und miR-16-1 zurückzuführen [83].

Zudem zeigen Daten, dass Krebszellen häufig auf Apoptose vorbereitet sind [84]. Dieser als „mitochondriales Priming“ (*engl.* Vorbereitung) beschriebene Zustand beschreibt, wie nahe eine Zelle sich an einer MOMP und wie kurz sie sich folglich vor Einleitung der intrinsischen Apoptose befindet [85]. Das Priming ist eine kritische Determinante dafür, ob eine Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt auf ein apoptotisches Signal reagiert oder nicht [85]. Bei hämatologischen Neoplasien wie dem Multiplen Myelom (MM), der AML und der ALL wurde bereits ein direkter Zusammenhang zwischen dem klinischen Ansprechen auf eine zytotoxische Chemotherapie und dem mitochondrialen Priming vor Therapie festgesetzt [86]. Bei Patientenzellen mit höherer Neigung zu Apoptose vor Therapie wurde ein besseres Ansprechen auf die Behandlung beobachtet [86]. Umgekehrt zeigten sich Tumorzellen durch Überexpression von BCL-2 *in vitro* und *in vivo* refraktär gegenüber Radio- und Chemotherapie [77].

Die Erkenntnis, dass BCL-2 und weitere Mitglieder der BCL-2-Familie eine essenzielle Rolle bei der Tumorgenese bzw. bei Therapieresistenzen spielen und *BH3-only* Proteine Schlüsselinitiatoren von Apoptose sind, führte zur Entwicklung von Arzneimitteln, die die Wirkung der BH3-Domäne nachahmen und in der Lage sind, Apoptose durch die Bindung an ein oder mehrere Mitglieder der BCL-2-Familie wiederherzustellen [80]. Mit der Entwicklung dieser sog. BH3-Mimetika ist eine neue Klasse von Tumormedikamenten entstanden. Sie induzieren Apoptose, indem sie die Aktivität natürlicher Antagonisten von BCL-2 und anderen verwandten Proteinen imitieren [80].

1.2.3. BH3-Mimetika und ihr Wirkmechanismus

In diesem Zusammenhang wurde eine Reihe von natürlichen oder synthetischen niedermolekularen Inhibitoren von Proteinen der antiapoptotischen BCL-2-Familie entdeckt.

ABT-737

ABT-737, entwickelt von Abbott Laboratories (North Chicago, IL, USA), gilt dabei als Prototyp der BH3-Mimetika [80]. Die Substanz wurde unter Verwendung eines auf Kernspinresonanz basierenden Screeningverfahrens für kleine Moleküle, die an die BH3-Bindungsstelle von BCL-xL binden, identifiziert [80]. ABT-737 bindet mit einer hohen Affinität die antiapoptotischen Proteine BCL-2, BCL-xL und BCL-w und blockiert damit ihre Funktion (siehe **Abbildung 5**) [80]. Die zytotoxische Wirkung von ABT-737 wurde sowohl gegen etablierte Zelllinien, die aus lymphoiden Neoplasien generiert wurden, als auch in *in vitro* Versuchen an humanen Primärproben von Patient*innen mit Follikulärem Lymphom und CLL beobachtet [87]. Zudem wurde gezeigt, dass ABT-737 in verschiedenen Tumorzelllinien synergistisch zu Radiotherapie und Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Cisplatin und Etoposid wirkt [87]. In weiteren *in vitro* Versuchen am

Zelllinienmodell konnte bewiesen werden, dass die Substanz Wirksamkeit gegen hämatologische Neoplasien wie dem Multiplen Myelom und der AML aufweist, ohne dabei gesunde hämatopoetische Zellen zu beeinträchtigen [88, 89]. Der Antitumoreffekt von ABT-737 ist allerdings trotz der vielversprechenden Daten sehr heterogen. Resistenzen gegenüber ABT-737 sind meist anderen Mitgliedern der BCL-2-Familie zugeschrieben, die nicht mit ABT-737 interagieren, - insbesondere MCL1 [90]. Trotz der günstigen präklinischen Daten wurde die Entwicklung von ABT-737 für die klinische Anwendung aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit und der mangelnden oralen Bioverfügbarkeit eingestellt [80]. Stattdessen folgte die Weiterentwicklung des BH3-Mimetikums zum oral verfügbaren Navitoclax (ABT-263). Wie sein Vorgänger interagiert Navitoclax mit hoher Affinität mit BCL-2, BCL-xL und BCL-w, besitzt jedoch keine Aktivität gegen MCL1 und A1 [91]. Auch diese Substanz zeigte in *in vitro* Versuchen Aktivität gegen zahlreiche Tumorzelllinien, einzeln als auch in Kombination mit Chemotherapie [80]. Ähnlich wie beim Vorgänger ABT-737 hängt die Apoptoseinduktion von der Neutralisation von MCL1 ab [91]. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse des Pan-BCL-2-Inhibitors *in vitro* und *in vivo* wurde die Substanz in einer Phase-I-Studie bei Patient*innen mit rezidivierten oder refraktären lymphoiden Neoplasien erprobt, wobei bei 10 von 46 Patient*innen teilweise antitumorale Wirkung festgestellt wurde (clinicaltrials.gov, NCT00406809) [92]. Allerdings induziert Navitoclax (ähnlich ABT-737) als Folge der Blockierung von BCL-xL *in vivo* eine Apoptose zirkulierender Blutplättchen, was sich klinisch als schnelle, aber reversible Thrombozytopenie, äußert [91]. In der klinischen Erprobung wurde dieser Effekt als dosislimitierende Toxizität identifiziert [92]. Aktuell sind noch 14 klinische Studien zur Erprobung von Navitoclax, v.a. bei Myeloproliferativen Neoplasien, aktiv (clinicaltrials.gov, Stand November 2021).

ABT-199

Die Entwicklung selektiver Inhibitoren für BCL-2 und BCL-xL ist aufgrund der hohen Ähnlichkeit ihrer BH3-Domäne erschwert [93]. Mittels „Reverse Engineering“ (engl. umgekehrt entwickeln) wurde das neue *small molecule* ABT-199 (Venetoclax) entwickelt, um die ungünstige Wirkung von Navitoclax auf Thrombozyten als Folge der BCL-xL-Inhibition zu überwinden und gleichzeitig die antitumorale Aktivität beizubehalten [94]. Im Gegensatz zu Navitoclax bindet und neutralisiert Venetoclax hauptsächlich BCL-2, während es nur schwach mit BCL-xL und BCL-w interagiert und somit die Thrombozyten kaum beeinflusst [94]. In präklinischen Studien zeigte der oral verfügbare BCL-2-Inhibitor eine zytotoxische Aktivität gegen zahlreiche Zelllinien, die von ALL, AML und Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) abgeleitet sind [94]. In *in vitro* und *in vivo* Studien wurde Venetoclax eine geringere hämatologische Toxizität im Vergleich zu Navitoclax attestiert [95].

Versuche mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD zeigten, dass der durch Venetoclax eingeleitete Zelltod stark von der Caspaseaktivierung in den Zellen abhängt [94]. Zudem scheint vor allem BIM der Hauptinitiator der durch dieses BH3-Mimetikum induzierten Apoptose zu sein [95]. In Zellen mit niedrigem BIM Level ist die Suszeptibilität gegenüber Venetoclax gänzlich aufgehoben [95]. Aufgrund der vielversprechenden präklinischen Daten wurde eine erste Phase-1-Studie bei Patient*innen mit rezidivierter oder refraktärer CLL bzw. kleinzelligem lymphozytischen Lymphom durchgeführt, um die Sicherheit und Wirksamkeit von Venetoclax zu untersuchen (clinicaltrials.gov, NCT01328626) [96]. Dabei zeigten sich hohe Ansprechraten sowohl bei Patient*innen mit günstigen als auch ungünstigen Mutationsprofilen bei gleichzeitig niedriger Toxizität [96]. Weitere klinische Studien konnten den bahnbrechenden Erfolg von Venetoclax als Therapeutikum beschleunigen [80]. Stand November 2021 ist Venetoclax (Handelsname *Venclyxto*®) in Deutschland offiziell für die Therapie von CLL (mit p53-Mutation oder 17p-Deletion bzw. nach Versagen einer Erstlinientherapie) zugelassen [18]. In den USA ist Venetoclax durch die FDA auch bereits als Kombinationstherapie mit der hypomethylierenden Substanz Azacitidin (5-AZA) oder niedrigdosiertem Cytarabin (LDAC) als Ersttherapie für nicht intensiv therapierbare Patient*innen mit AML zugelassen, eine Zulassung durch die EMA wird erwartet [97]. Aktuell sind 226 Studien zur klinischen Erprobung von Venetoclax aktiv (clinicaltrials.gov, Stand November 2021), unter anderem dürfen auch probatorisch Patient*innen mit CEL-NOS, MPN-Eo und MLN-Eo eingeschlossen werden (clinicaltrials.gov, NCT03862157, Stand November 2021).

S63845

In weiteren auf Kernspinresonanz basierenden Screeningverfahren für kleine Moleküle konnte der selektive und potente MCL1-Inhibitor S63845 identifiziert werden [19]. Auch MCL1-Genamplifikationen finden sich häufig bei Krebserkrankungen, wichtige onkogene Signalwege können durch Transkriptions- oder Posttranskriptionsmechanismen zu einer erhöhten Expression des MCL1-Proteins führen [98]. MCL1 unterscheidet sich von anderen Mitgliedern der BCL-2-Familie durch eine sehr kurze Halbwertszeit [98]. Eine Hemmung seiner Expression bzw. Neutralisierung seiner antiapoptotischen Funktion macht MCL1-abhängige Zellen anfälliger für Apoptose und bietet so ein gutes therapeutisches Target [98]. Im Zelllinien- als auch im Mausmodell konnten für das BH3-Mimetikum S63845 bereits erste antitumorale Effekte gegen Lymphom-, Myelom- und Leukämiezellen nachgewiesen werden [19, 99]. Im Gegensatz zum MCL1-Gen-Knockout Mausmodell mit kritischer Toxizität gegenüber hämatopoetischen Stammzellen und Kardiomyozyten, konnte für die pharmakologische MCL1-Proteininhibition nur milde toxische Effekte nachgewiesen werden [19]. Therapeutisch effektive Dosierungen zeigten

sich im Mausmodell als allgemein gut verträglich [19]. Der MCL1-Inhibitor S63845 wurde bis heute noch nicht in klinischen Studien getestet, die weiterentwickelte Substanz S64315 [100] befindet sich aktuell in Phase-I-Studien für Patient*innen mit AML oder MDS (clinicaltrials.gov, NCT02979366, NCT03672695, NCT04629443).

WEHI-539

Auch das BCL-2-Protein BCL-xL wird vor allem in soliden Tumoren häufig überexprimiert und macht maligne Zellen resistent gegenüber Krebstherapeutika [101]. Das *small molecule* WEHI-539 ist in der Lage spezifisch BCL-xL zu neutralisieren. Ähnlich wie bei Navitoclax konnten hier im präklinischen Modell thrombozytotoxische Effekte nachgewiesen werden, sodass keine weitere klinische Erprobung der Substanz folgte [101]. WEHI-539 eignet sich jedoch hervorragend, um im präklinischen Modell die Rolle von BCL-xL *in vitro* zu untersuchen [101].

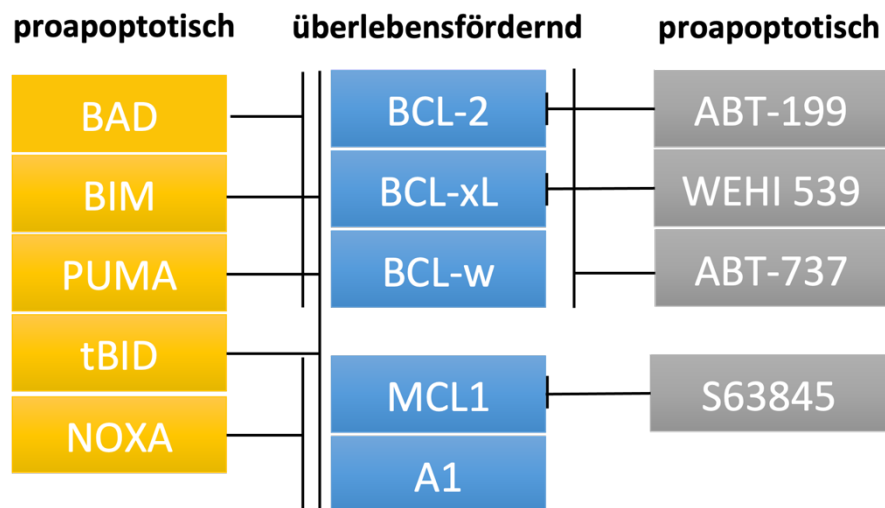


Abbildung 5: Die wichtigsten BH3-Mimetika und ihre Interaktion mit den wichtigsten proapoptotischen und überlebensfördernden BCL-2-Proteine in der Übersicht, modifiziert nach Adams and Cory 2007 [77].

1.2.4. Zelltodregulierende Mechanismen in eosinophilen Granulozyten

Eosinophile Granulozyten sind Entzündungszellen, die hauptsächlich an der Immunabwehr gegen Parasiten beteiligt sind [1]. Sie spielen eine wichtige Rolle in späten Stadien einer Entzündungsreaktion und sind an der Pathophysiologie vieler chronisch entzündlicher Erkrankungen beteiligt, insbesondere bei Asthma bronchiale und Neurodermitis [1]. Insbesondere für Zellen mit kurzer Lebensdauer wie eosinophile Granulozyten ist ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod essenziell für eine effektive Homöostase und unerlässlich für die Immunregulation [102].

Eosinophilie kann folglich aufgrund vermehrter Eosinophilenproliferation und/oder gehemmter Apoptose entstehen [74]. Auch Zytokine wie GM-CSF (Granulozyten-

Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor), Interleukin-3 (IL3) und IL5 können das Überleben von Eosinophilen fördern. Eosinophilie steht deswegen in direktem Zusammenhang mit Erkrankungen, die mit der Aktivierung von T-Lymphozyten und der Produktion spezifischer Zytokine einhergehen (z.B. EGPA, L-HES) [74]. Ein Zusammenhang zwischen den drei genannten Zytokinen und der Hochregulation des antiapoptotischen BCL-xL über den Transkriptionsfaktor NF- κ B (engl. *nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) ist in der Literatur beschrieben [103]. Schwartz et al. konnten dabei zudem zeigen, dass eine retrovirale Überexpression von BCL-xL das Überleben von Eosinophilen förderte, während die pharmakologische Hemmung von BCL-xL bei normalen murinen oder humanen Eosinophilen Apoptose induzierte [103]. BH3-Mimetika zeigten in Studien eher geringe Effekte auf gesunde murine und humane eosinophile Granulozyten [104].

Interessanterweise scheint das antiapoptotische Protein BCL-2 selbst nicht in reifen eosinophilen Granulozyten exprimiert zu werden [105], die Datenlage ist hierzu allerdings nicht ganz eindeutig [106]. Im Gegensatz dazu wurde durchweg gezeigt, dass gesunde Eosinophile die antiapoptotischen Proteine BCL-xL und MCL1 sowie das proapoptotische BAX exprimieren [105]. Ein 2016 veröffentlichter Artikel von Kotzin et al. zeigte zudem, dass eine Herunterregulation des proapoptotischen BH3-*only* Proteins BIM das Überleben von „aberranten“ eosinophilen Granulozyten kontrolliert. Insbesondere wurde in dieser Publikation gezeigt, dass die *long non-coding RNA* (engl. lange nicht-kodierende RNA) Morrbid die Transkription des Gens für das proapoptotische BIM entgegengesetzt reguliert und dass Morrbid bei Patient*innen mit hypereosinophilieassoziierten Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollproband*innen signifikant hochreguliert ist [107]. Ähnliche Beobachtungen konnten Cai et al. anhand eines Mausmodells für CMML, AML und MPN in einem 2020 veröffentlichten Report zeigen [108].

Es besteht kein Zweifel daran, dass die fehlerhafte Regulation der Apoptose von eosinophilen Granulozyten mit (Hyper-)Eosinophilie einhergeht [74].

1.3. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Eosinophilien sind eine sehr heterogene Krankheitsgruppe aus hämatologischen und nichthämatologischen Diagnosen. Während bei niedrigeren Eosinophilenzahlen die Patient*innen meist symptomfrei bleiben, kann die klinische Präsentation von Hypereosinophilie bei hoher Zelllast sehr divers sein - durch die recht unspezifische Gewebemigration sind Organbeteiligungen im gesamten menschlichen Organismus möglich. Manche Subformen der Hypereosinophilie, z.B. die CEL-NOS, gehen mit einer schlechten

Überlebensprognose einher. Therapieoptionen sind oft limitiert, Ziel ist bei den meisten hypereosinophilieassoziierten Erkrankungen eine symptomatische Therapie und Zytoreduktion mittels nebenwirkungsreichen Cortikosteroiden. Dysregulierter Zelltod scheint bei Patient*innen mit Hypereosinophilie eine zentrale zu spielen (siehe **Kapitel 1.2.4**), die Induktion von Zelltod ist ein modernes Therapiekonzept in der Hämatologie und Onkologie (siehe **Kapitel 1.2.2** und **Kapitel 1.2.3**).

Ziel dieser Dissertation war es, eosinophile Granulozyten von Patient*innen mit hypereosinophilieassoziierten Erkrankungen und Eosinophile von gesunden Spender*innen hinsichtlich ihres Apoptoseverhaltens zu untersuchen. Dabei wurden vor allem die Expressionslevel zentraler BCL-2-Proteine direkt miteinander verglichen und das Verhalten auf Apoptoseinduktion mittels BH3-Mimetika *in vitro* analysiert. Zudem wurden myeloide Progenitorzellen aus Patientenmaterial und aus gesundem Spendermaterial auf ihr *in vitro* Ansprechen auf ebendiese zielgerichtete Therapie untersucht.

Die im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Daten sollen das Verständnis bezüglich des apoptotischen Verhaltens eosinophiler Granulozyten erweitern und einen Grundstein für die klinische Translation von BH3-Mimetika bei Hypereosinophilie setzen.

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Rahmen eines Vortrages auf der DGHO Jahrestagung 2019 gezeigt [109] und im *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* unter dem Titel „*Comprehensive characterization of central BCL-2 family members in aberrant eosinophils and their impact on therapeutic strategies*“ [110] vom Verfasser dieser Dissertation als Erstautor veröffentlicht.

2. Material und Methoden

2.1. Arbeitsmaterialien

2.1.1. Chemikalien und biogene Substanzen

Agarose	Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen
Aqua ad injectabilia	Berlin-Chemie, Berlin
Calciumchlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Dimethyl sulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Life Technologies, Calsbad, USA
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Formaldehydlösung 4% (PFA)	MEDITE, Burgdorf
HEPES Buffer	AppliChem, Darmstadt
2-Mercapto-Ethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
Trichlormethan/Chloroform	Roth, Karlsruhe
TRizol® Reagent	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tris Base	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Thermo Fisher, Waltham, USA

2.1.2. Reagenzien

ABT-199 BCL-2 Inhibitor	AbbVie, North Chicago, USA
ABT-737 pan-BCL-2 Inhibitor	Active Biochem, Maplewood, USA
Biocoll Separating Solution 1.077 g/ml	Biochrom, Berlin
CD16 MicroBeads, human	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
GeneRuler Express DNA Ladder, ready to use	Thermo Fisher, Waltham, USA
Human LDL	Stemcell, Vancouver, Canada

Recombinant human IL5	Biolegend, San Diego, USA
Recombinant human IL3	R&D Systems, Minneapolis, USA
Recombinant human IL6	R&D Systems, Minneapolis, USA
Recombinant human SCF	Stemcell, Vancouver, Canada
Recombinant human Thrombopoietin	R&D Systems, Minneapolis, USA
Shandon Kwik-Diff Färbelösung	Thermo Fisher, Waltham, USA
S63845 MCL1 Inhibitor	Active Biochem, Maplewood, USA
SYBR Safe DNA Gel Stain	Thermo Fisher, Waltham, USA
WEHI-539 BCL-xL Inhibitor	Aobious, Gloucester, USA

2.1.3. Pufferlösungen

DPBS, sterile-filtered, endotoxin tested	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
FBS Good Forte	PAN Biotech, Aidenbach
HEPES Buffer solution 1M	Life Technologies, Calsbad, USA

Annexin-5A-Bindungspuffer

10mM HEPES pH 7,4
140mM Natriumchlorid
2,5mM Calciumchlorid
3% FBS Good Forte
Aqua dest.

3 bzw. 20% Facs-Puffer

97 bzw. 80% DPBS
3 bzw. 20% FBS Good Forte

MACS-Puffer

DPBS, sterile-filtered, endotoxin tested
2mM EDTA
0,5% FBS Good Forte

TAE-Puffer (10-fach)

Aqua dest.

0,4M Tris Base

1,1% Essigsäure

2% 0,5M EDTA (pH 8)

RBC Lysis Buffer

Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.4. Zelllinien, Medienzusätze, Zellkulturmedien

HL-60 Zelllinie

DSMZ, Braunschweig

KG-1 Alpha Zelllinie

DSMZ, Braunschweig

BIT 9500

Stemcell, Vancouver, Kanada

FBS Good Forte

PAN Biotech, Aidenbach

IMDM

Life Technologies, Calsbad, USA

L-Glutamin 200mM

Life Technologies, Calsbad, USA

MEM NEAA

Life Technologies, Calsbad, USA

2-Mercapto-Ethanol 50mM for Cell Culture

Life Technologies, Calsbad, USA

Methocult H4435

Stemcell, Vancouver, Kanada

Penicillin / Streptomycin

Life Technologies, Calsbad, USA

RPMI 1640

Life Technologies, Calsbad, USA

Sodium Pyruvat 100mM

Life Technologies, Calsbad, USA

Zelllinien Medium

RPMI 1640

10% FBS Good Forte

100 IU/ml Penicillin / 10µg/ml Streptomycin

Eosinophilen Medium (EoM)

RPMI 1640

20% FBS Good Forte

25mM HEPES

2mM L-Glutamin

1x MEM NEAA

1mM Sodium Pyruvat

50µM 2-Mercapto-Ethanol for Cell Culture

10ng/ml Human recombinant IL5

Serumfreies Medium (SFM)

IMDM

20% BIT 9500

100ng/ml Recombinant human SCF

5ng/ml Recombinant human IL6

10ng/ml Recombinant human IL3

10ng/ml Recombinant human Thrombopoietin

10µM 2-Mercapto-Ethanol for Cell Culture

4µg/ml Human LDL

2.1.5. Antikörper

Annexin-5A, FITC

Invitrogen, Carlsbad, USA

Human FcR Binding Inhibitor

Invitrogen, Carlsbad, USA

Mouse anti-human Siglec-8, APC, Clone 7C9

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Mouse anti-human CD-45, APC, Clone 2D1

Invitrogen, Carlsbad, USA

Mouse anti-human CD-34, eFluor 450
Clone 4H11

Invitrogen, Carlsbad, USA

7-AAD Viability Staining Solution, PerCP

Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.6. Oligonukleotide

Folgende 16 Primer (human) wurden entwickelt (siehe **Kapitel 2.3.2.5**) und von Sigma Aldrich bezogen.

Ziel RNA	Primer-Sequenz
BAK Vorwärts-Primer	5' - ACC AGC CTG TTT GAG AGT GG - 3'
BAK Rückwärts-Primer	5' - GGC CTA GGA AGC CAG TCA G - 3'
BAX Vorwärts-Primer	5' - TTT GCT TCA GGG TTT CAT CC - 3'
BAX Rückwärts-Primer	5' - ATC CTC TGC AGC TCC ATG TT - 3'
BCL-2 Vorwärts-Primer	5' - GAT AAC GGA GGC TGG GAT G - 3'
BCL-2 Rückwärts-Primer	5' - TCA CTT GTG GCC CAG ATA GG - 3'
BCL-w Vorwärts-Primer	5' - GGA CAA GTG CAG GAG TGG AT - 3'
BCL-w Rückwärts-Primer	5' - GTC CTC ACT GAT GCC CAG TT - 3'
BCL-xL Vorwärts-Primer	5' - CTT GGA TGG CCA CTT ACC TG - 3'
BCL-xL Rückwärts-Primer	5' - AAG AGT GAG CCC AGC AGA AC - 3'
MCL1 Vorwärts-Primer	5' - AGA AAG CTG CAT CGA ACC AT - 3'
MCL1 Rückwärts-Primer	5' CCA GCT CCT ACT CCA GCA AC - 3'
NOXA Vorwärts-Primer	5' - AAG AAG GCG CGC AAG AAC - 3'
NOXA Rückwärts-Primer	5' - TCC TGA GCA GAA GAG TTT GGA - 3'
PUMA Vorwärts-Primer	5' - GGG GAG GAG GAA CAG TGG - 3'
PUMA Rückwärts-Primer	5' - AGG AGT CCC ATG ATG AGA TTG T - 3'

Tabelle 2: Erstellte Primer-Sequenzen

Folgende sechs Primer sind aus einer Publikation von Kotzin et al. [107] übernommen und wurden von Sigma Aldrich erworben.

Ziel RNA	Primer-Sequenz
Bim Vorwärts-Primer	5' - GGT CCT CCA GTG GGT ATT TCT CTT - 3'
Bim Rückwärts-Primer	5' - ACT GAG ATA GTG GTT GAA GGC CTG G - 3'
MORRBID Exon 1 Vorwärts-Primer	5' - ACT GGA TGG TCG CTG CTT TT - 3'
MORRBID Exon 1 Rückwärts-Primer	5' - CTT CCC AGG AAC TGT GCT GT - 3'
HPRT Vorwärts-Primer (Housekeeping Gen)	5' - GCT ATA AAT TCT TTG CTG ACC TGC TG - 3'
HPRT Rückwärts-Primer (Housekeeping Gen)	5' - AAT TAC TTT TAT GTC CCC TGT TGA CTG G - 3'

Tabelle 3: Primer-Sequenzen aus Kotzin et al. 2016 [107].

2.1.7. Molekularbiologische Kitsysteme

GoTaq® Green Master Mix	Promega, Fitchburg, USA
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega, Fitchburg, USA
IL-5 ELISA Kit	Biorbyt, Cambridge, UK
Nucleospin RNA Extraction Kit	Machery Nagel, Düren
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Quiagen, Venlo, Niederlande

2.1.8. Standardgeräte

Biometra TAdvanced Thermocycler	Analytic Jena, Jena
CO ₂ -Inkubator	Binder, Tuttlingen
Cytospin 2 Zentrifuge	Shandon, Frankfurt am Main
Dampfsterilisator	Systemec, Linden
FACSCanto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Feinwaage	VWR, Darmstadt
GloMax® Discover Microplate Reader	Promega, Fitchburg, USA
LightCycler® 480 Instrument II	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
MidiMACS Multistand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikrozentrifuge	Starlab, Hamburg

Nanodrop	Peqlab, Erlangen
Neubauer Zählkammer	Reichert, New York, USA
Noviomagus Bone Mill	Spierings Tissue Processing, Nijmegen, Niederlande
PowerPac Basic Power Supply	Bio Rad, München
Rotina 420R und Rotina 380R	Hettich, Tuttlingen
SDS Elektrophoresekammer	Bio Rad, München
Sterile Werkbank	Thermo Scientific, Waltham, USA
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Vortex	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	VWR, Darmstadt

2.1.9. Verbrauchsmaterialien

Einmal Spritzen (2ml, 20ml)	B.Braun, Melsungen
Eppendorf-Röhrchen (500µl, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen (5ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon Röhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Falcon Zellsieb (40µm, 100µm)	Corning, Corning, USA
Kryoröhrchen (1,5ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Lightcycler Platte (96 Well)	Sarstedt, Nümbrecht
MACS LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikrotiterplatte (96 Well)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
PCR-Röhrchen	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen gestopft (10µl, 20µl, 200µl, 500µl)	Th. Geyer, Renningen
Pipettenspitzen ungestopft 10µl, 20µl, 200µl, 500µl	Hartenstein, Würzburg
Zellkulturflasche (25cm ² , 75cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht

Zellkulturplatten (24-well) TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.10. Verwendete Software

BD FACSDIVA™ Software	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
FlowJo, Version 10.5.3	Flowjo, LLC, Ashland, USA
GraphPad PRISM 7	GraphPad Software, San Diego, USA
IBM SPSS Statistics 25	IBM, Armonk, USA
LightCycler® 480 Software	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
Microsoft Excel for Mac, Version 16.20	Microsoft, Redmond, USA
Multiple Primer Analyzer	Thermo Fisher, Waltham, USA

2.2. Studienmaterial

2.2.1. Untersuchungsmaterial

Für die vorliegende Studie wurden vor allem primäre Patientenproben untersucht, die im Rahmen der klinischen Routine zur Erstdiagnostik und zur Therapiekontrolle entnommen wurden. Dabei wurde den Proband*innen vor allem Blut aus venöser Punktion mittels Flügelkanüle und Knochenmarksaspirat aus Punktion des Beckenkamms mittels Jamshidi-Nadel abgenommen. Das mit EDTA versetzte periphere Blut und/oder das heparinisierte Knochenmarksaspirat wurde freundlicherweise von PD Dr. med. Stefanie Jilg und Prof. Dr. med. Philipp Jost (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Klinikum rechts der Isar der TU München), PD Dr. med. Philipp Moog (Abteilung für Nephrologie, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II, Klinikum rechts der Isar der TU München), Dr. med. univ. Khalid Shoumariyeh (Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Freiburg), Dr. med. Juliana Schwaab und Prof. Dr. med. Andreas Reiter (III. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Mannheim) zur Verfügung gestellt.

Eine gesunde Kontrollkohorte (venöses Blut) wurde aus einem Kollektiv an Mitarbeitenden der III. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TU München und der Forschungseinrichtung TranslaTUM rekrutiert.

Eine weitere gesunde Kontrollkohorte (Knochenmark) wurde aus gesunden, explantierten Hüftköpfen generiert. Basis dafür boten Knochenfragmente, die routinemäßig bei der operativ-orthopädischen Installation von Hüfttotalendoprothesen anfallen. Diese wurden

uns freundlicherweise über eine Kooperation mit Michele Buck und Prof. Dr. med. Katharina Götze (Klinik und Poliklinik III, Klinikum rechts der Isar der TU München) zur Verfügung gestellt.

Für alle Patientenproben und gesunden Kontrollen (Blut und Knochenmark) wurde zuvor eine Informierte Einwilligung der Proband*innen eingeholt, wie in der Deklaration von Helsinki festgelegt. Ein positives Votum der Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar der TU München lag vor (Votum Projekt 62/16S), die Grundsätze der neuen Datenschutzgrundverordnung (DSGVO, gültig ab 28. Mai 2018) wurden mit in die Informierte Einwilligung mitaufgenommen.

2.2.2. Studienpopulation und Patientencharakteristika

Im Rahmen dieses Promotionsprojektes wurden Blut- und Knochenmarksproben von insgesamt 45 Patient*innen rekrutiert, die an einer Erkrankung mit Hypereosinophilie leiden. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über das Patient*innenkollektiv mit Angaben zum Alter, Geschlecht, Typ der Eosinophilie, zur maximalen Eosinophilenzahl im Blut (relativ in % der Gesamtleukozytenzahl und absolut in G/L), (Vor-)Therapie und zum Manifestationsort der klinischen Symptomatik.

ID	Alter	Geschlecht	Typ der Eosinophilie	Max. Eosinophile im Blut (%)	Max. Eosinophile im Blut (G/L)	(Vor-)Therapie	Ort der Hauptsymptome / Eosinophileninfiltration	Kommentar
1	66	m	reaktiv	72	3,9	Corticosteroide	GI	Primär Sklerosierende Cholangitis
2	60	w	reaktiv	25	2,5	Corticosteroide	GI, Haut	
3	27	w	reaktiv	NA	NA	NA	NA	Hodgkin Lymphom
4	67	m	HES	NA	NA	NA	Lunge	
5	33	w	HES	47	15,0	Corticosteroide	GI, Haut	
6	49	m	HES	24	2,2	Corticosteroide	Haut, PNS	Angioödem
7	58	w	HES	15	0,8	keine	HNO, Lunge, Niere	Mastzellproliferation im Knochenmark, aber keine Mastozytose
8	28	w	HES	9	0,3	Fexofenadin	Haut, Lunge, rezidivierende Anaphylaxie	Mastzellproliferation im Knochenmark, aber keine Mastozytose
9	76	m	HES	8	0,5	keine	Allergie, Haut, Lunge	Angioödem
10	36	m	HES	38	5,7	NA	Herz	
11	33	m	HES	39	5,7	NA	GI, Lunge, Niere	ANV
12	49	m	HES	29	1,8	Corticosteroide	Niere	Thrombozytopenie
13	62	w	HES	NA	NA	NA	Herz	
14	62	m	HES	67	15,8	keine	Allergie, GI, Lunge	
15	57	w	HES	35	2,6	keine	Allergie, Herz, HNO, Lunge	

16	62	m	HES	49	6,2	Corticosteroide, Mesalazin, Adalimumab	GI, Lunge, PNS	Primär Sklerosierende Cholangitis
17	35	m	HES	NA	NA	Corticosteroide	Haut	
18	35	m	HES	NA	NA	keine	GI	
19	68	w	HES	NA	NA	keine	NA	Multiples Myelom
20	47	m	HES	8	0,4	NA	Allergie, Haut, Lunge	
21	54	m	HES	35	2,6	keine	Herz	
22	40	w	L-HES	NA	NA	NA	NA	
23	69	w	L-HES	18	1,9	R-CHOP	Allergie	DLBCL
24	78	w	MLN-Eo	60	8,0	Corticosteroide	GI	FIP1L1-PDGFR α +
25	56	m	MLN-Eo	NA	NA	NA	NA	Anämie, Thrombozytopenie, Splenomegalie; FIP1-PDGFR α +
26	57	m	CEL-NOS	34	4,5	Corticosteroide	Herz	DNMT3A Mutation
27	70	w	CEL-NOS	90	68,0	Hydroxyurea	NA	>5% Blasten in KM
28	80	m	CEL-NOS	28	7,4	Corticosteroide	NA	Anämie, Splenomegalie; ASXL-1, CBL, SRSF2, TET2, KIT D816V Mutationen
29	62	m	CEL-NOS	NA	NA	NA	NA	JAK2 p.F556V exon 13 Mutation
30	67	m	CEL-NOS	27	2,5	Corticosteroide	Allergie, Lunge	5-10% Blasten im KM
31	62	w	CEL-NOS	NA	NA	keine	Allergie, Herz	TET2, KIT D816V Mutationen
32	82	m	CEL-NOS	40	10,0	keine	NA	34% Blasten im KM

33	62	m	CEL-NOS	6	0,6	Corticosteroide	Lunge	DNMT3A, SF3B1 Mutation
34	75	w	CEL-NOS	44	32,0	keine	NA	JAK2-V617F Mutation
35	65	w	EGPA	36	3,9	Rituximab	HNO, Lunge, PNS	ANCA negativ
36	49	w	EGPA	17	1,7	IVIG	HNO, Lunge	ANCA negativ
37	82	w	EGPA	7	0,5	Mepolizumab	HNO, Lunge	ANCA negativ
38	48	w	EGPA	28	1,5	keine	HNO, Lunge	ANCA negativ
39	55	w	EGPA	16	1,4	Corticosteroide	HNO, Lunge	ANCA negativ
40	43	w	EGPA	52	11,5	Azathioprin	Allergie, HNO, Herz, Lunge	ANCA negativ
41	47	m	EGPA	8	0,4	keine	HNO, Lunge	ANCA negativ
42	66	w	EGPA	NA	NA	Mepolizumab	Haut, Herz, HNO, Lunge, Niere	ANCA negativ
43	78	w	EGPA	24	3,1	Corticosteroide	Herz, Lunge	ANCA negativ
44	77	m	EGPA	35	6,0	Corticosteroide	Haut, Lunge, Niere, PNS	ANCA negativ
45	57	w	EGPA	66	19,8	keine	Haut, Lunge	ANCA negativ

Tabelle 4: Patient*innenkollektiv und klinische Charakteristika. w = weiblich, m = männlich, BMMCs = mononukleäre Knochenmarkszellen, R-CHOP = Chemotherapie bestehend aus Rituximab/Cyclophosphamid/Hydroxydaunorubicin/Vincristin/Prednisolon, NA = nicht verfügbar, GI = Gastrointestinaltrakt, PNS = Peripheres Nervensystem, HNO = Hals-Nase-Ohr, KM = Knochenmark, ANV = Akutes Nierenversagen, DLBCL = Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, ANCA = Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper, IVIG = intravenöse Immunglobuline.

	Anzahl der Proband*innen	Anteil in % der Gesamtpopulation	Durchschnittliches Alter in Jahren
männlich	22	48,9	57,3
weiblich	23	51,1	57,8
gesamt	45	100	57,6

Tabelle 5: Patient*innenkollektiv nach Geschlecht und Alter.

Diagnose	Anzahl der Proband*innen	Anteil in % der Gesamtpopulation
reaktiv	3	6,7
HES	18	40
L-HES	2	4,4
MLN-Eo	2	4,4
CEL-NOS	9	20
EGPA^{ANCA-}	11	24,4

Tabelle 6: Patient*innenkollektiv nach Diagnose.

Ort der Hauptsymptome	Anzahl der Proband*innen	Anteil der Proband*innen in %
Herz	8	17,8
Lunge	22	48,9
Niere	5	11,1
GI	6	13,3
PNS	4	8,9
Haut	10	22,2
HNO	10	22,2
Allergieneigung	11	24,4

Tabelle 7: Klinische Manifestationen, nach Organsystem. GI = Gastrointestinaltrakt, PNS = Peripheres Nervensystem, HNO = Hals-Nase-Ohr.

2.2.3. Gesunde Kontrollkohorte

Im Rahmen dieses Promotionsprojektes wurden Blutproben von insgesamt 14 gesunden Kontrollproband*innen und Knochenmarksproben von insgesamt 9 gesunden Spender*innen eingeschlossen. Folgende Tabellen sollen einen kurzen Überblick über das Spenderkollektiv bieten.

ID	Alter	Geschlecht
1	23	m
2	24	m
3	30	w
4	24	m
5	26	m
6	24	w
7	40	w
8	44	w
9	38	w
10	23	w
11	35	w
12	40	w
13	39	w
14	50	w

Tabelle 8: Kollektiv der gesunden Blutspender*innen. w = weiblich, m = männlich.

	Anzahl der Proband*innen	Anteil in % der Gesamtpopulation	Durchschnittliches Alter in Jahren
männlich	4	28,6	24,3
weiblich	10	71,4	36,3
gesamt	14	100	57,6

Tabelle 9: Kollektiv der gesunden Blutspender*innen nach Geschlecht und Alter.

ID	Alter	Geschlecht
1	51	w
2	71	w
3	59	m
4	48	m
5	66	m
6	84	w
7	71	w
8	69	w
9	51	w

Tabelle 10: Kollektiv der gesunden Knochenmarkspender*innen. w = weiblich, m = männlich.

	Anzahl der Proband*innen	Anteil in % der Gesamtpopulation	Durchschnittliches Alter in Jahren
männlich	3	33,3	57,7
weiblich	6	66,6	66,2
gesamt	9	100	63,3

Tabelle 11: Kollektiv der gesunden Knochenmarkspender*innen nach Geschlecht und Alter.

2.3. Methoden

2.3.1. Zellbiologische Methoden Teil I: Zellpräparation

Humanes Primärmaterial wurde wie in folgender Grafik und folgenden Kapiteln (siehe **Kapitel 2.3.1.1, 2.3.1.2 und 2.3.1.3**) beschrieben verarbeitet. Alle Arbeitsschritte der Zellseparation und Zellkultivierung erfolgten lege artis in steriler Atmosphäre an einer ventilerten Werkbank unter konstanten Arbeitsbedingungen bei 20°C Raumtemperatur.

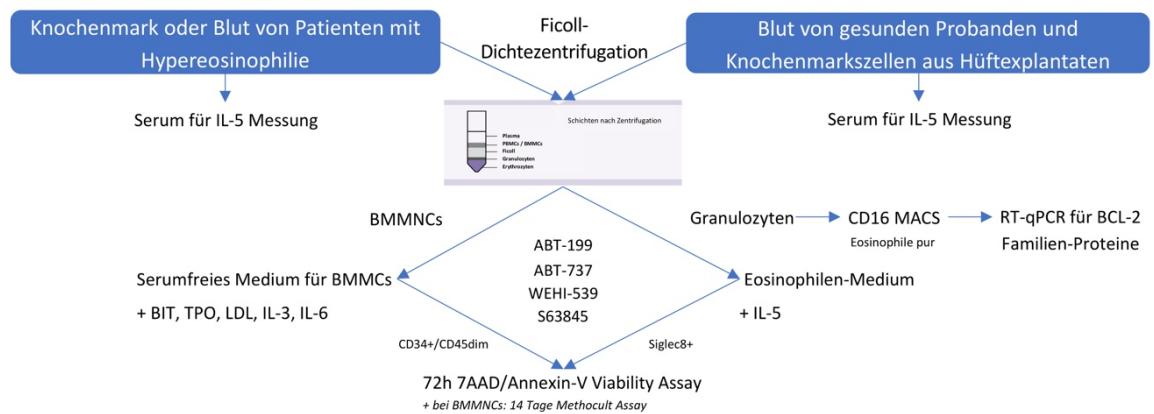


Abbildung 6: Flowchart Probenverarbeitung. MACS = magnetic cell sort, BIT = bovine albumin/insulin/transferrin, TPO = Thrombopoetin.

2.3.1.1. Präparation und Kultur primärer humaner Knochenmarkszellen

5 bis 10ml heparinisiertes Knochenmarksaspirat (siehe **Kapitel 2.2.1**) wurde aus der Punktionspritze ad 25ml mit DPBS verdünnt und anschließend in einem 50ml Falcon auf 25ml Biocoll Separating Solution 1.077 g/ml geschichtet. Nach einer Dichtezentrifugation bei Raumtemperatur für 15 Minuten bei 800g wurde die über dem Ficoll schwimmende Zellschicht aus mononukleären Zellen (BMMC: engl. *bone marrow mononuclear cells*) entnommen. Nach erneuter Zentrifugation mit 400g für 5 Minuten bei 4°C erfolgte eine Erythrozytendepletion für 5 Minuten mittels 5ml hypotonem Lysepuffer (RBC Lysis Buffer). Anschließend wurden die isolierten Zellen mit Trypanblau angefärbt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Jeweils 5×10^5 Zellen wurden in 1ml SFM in einer 24-Well-Platte ausgelegt und bei 37°C und 5% CO₂ für bis zu 72 Stunden in Kultur genommen.

2.3.1.2. Präparation und Kultur eosinophiler Granulozyten aus peripherem Blut

Bis zu 27ml venöses EDTA-Blut (siehe **Kapitel 2.2.1**) wurde direkt im Blutentnahmeröhrchen bei 400g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um im Anschluss das Blutplasma in 2ml Eppendorf-Tubes zu überführen und bei -80°C einzufrieren. Das zelluläre Material wurde mit DPBS aus den Blutentnahmeröhrchen gespült, in ein 50ml Falcon überführt und analog wie in **Kapitel 2.3.1.1** beschrieben weiterverarbeitet. Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC: engl. *peripheral blood mononuclear cells*) wurden hierbei nicht weiter untersucht.

Jeweils 5×10^5 granulozytäre Zellen wurden in 1ml EoM in einer 24-Well-Platte ausgelegt und bei 37°C und 5% CO₂ für bis zu 72 Stunden in Kultur genommen.

Eine Purifikation von eosinophilen Granulozyten zur weiteren Untersuchung mittels quantitativer Echtzeit-PCR erfolgte direkt nach Zellpräparation mittels MACS-Technologie (MACS: engl. *magnetic cell sort*, magnetische Zellsortierung). Nach Anleitung des Herstellers wurden die Zellen für 35 Minuten mit 50µl CD-16 MACS-Beads pro 5×10^5 Zellen inkubiert und anschließend mit MACS-Puffer gewaschen. Durch negative Zelldepletion mit MACS LS Columns konnten neutrophile Granulozyten entfernt werden, übrig blieb eine Zellpopulation aus eosinophilen Granulozyten. Zur Qualitätssicherung erfolgte mit 200µl der Zellsuspension eine Cytospin-Zentrifugation für 5 Minuten und eine Giemsa-Färbung (Kwik-Diff) mit anschließender lichtmikroskopischer Kontrolle. Ab einer Prozentzahl von $\geq 95\%$ eosinophile Granulozyten im repräsentativen Bildausschnitt wurde die Purifikation als erfolgreich eingestuft und die isolierten Zellen wie in **Kapitel 2.3.2.3** beschrieben weiterverarbeitet.

2.3.1.3. Präparation und Kultur primärer humaner Knochenmarkszellen aus Hüftexplantaten

Knochenfragmente, die routinemäßig bei Hüfttotalendoprothesenimplantation anfallen, wurden unmittelbar nach chirurgischer Explantation unter sterilen Bedingungen in einer Noviomagus Bone Mill gemörsert und in einer 500ml Glasflasche mit ca. 200ml DPBS vermischt. Nach einminütigem Schütteln wurde die Knochensuspension durch 100µm Zellsiebe in vier 50ml Falcons filtriert und im Anschluss bei 400g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach Aspiration des flüssigen Überstandes wurde das Zellpellet am Boden der Falcons in 25ml DPBS gelöst. Die weitere Probenverarbeitung und Zellextraktion gestalteten sich analog wie in **Kapitel 2.3.1.1** beschrieben.

Jeweils 5×10^5 Zellen wurden in 1ml SFM in einer 24-Well-Platte ausgelegt und bei 37°C und 5% CO₂ für bis zu 72 Stunden in Kultur genommen.

2.3.2. Zellbiologische Methoden Teil II: Inhibitionsversuche

2.3.2.1. Stimulationsexperimente mit BH3-Mimetika

Die in **Kapitel 2.3.1** beschriebenen Zellen wurden zusammen mit den BH3-Mimetika in *in vitro* Zellkultur genommen. Dabei wurden die Inhibitoren ABT-199, ABT-737, S63845 und WEHI-539 in DMSO gelöst und in einer Endkonzentration von 1µM eingesetzt, sofern nicht anders angegeben. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO in einer Verdünnung von 1:1000.

2.3.2.2. Untersuchung koloniebildender Einheiten

Der Methylcellulose-Test ist ein *in vitro* Test, der zur Untersuchung von hämatopoetischen Stammzellen verschiedener Entwicklungsstadien verwendet wird. Die Methode basiert auf der Fähigkeit hämatopoetischer Vorläuferzellen in einem halbfesten Medium unter Zusatz spezifischer Wachstumsfaktoren zu proliferieren und zu Kolonien zu differenzieren. Anschließend können die gebildeten Kolonien nach ihrer Morphologie charakterisiert werden.

Dafür wurde die kommerziell erworbene und mit Wachstumsfaktoren angereicherte Methylcellulose Methocult H4435 auf 3ml pro Kulturansatz portioniert und mit 35µl Penicillin/Streptomycin zur Infektionsprophylaxe versetzt. Die zu untersuchenden BMMC nach 72h Zellkultur mit BH3-Mimetika oder Lösungsmittelkontrolle wurden für den Methylcellulose-Test jeweils in 15ml Falcons überführt und mit 1x DPBS gewaschen. 2×10^4 viable Zellen wurden im Anschluss in 350µl IMDM gelöst und in die Methylcellulose gegeben. Nach gründlichem Mischen der Falcons wurde die Zellsuspension mithilfe einer Kanüle auf zwei Petrischalen (Durchmesser 3cm) ausplattiert. Anschließend erfolgte für 14 Tage eine Inkubation im Wasserbad bei 37°C und 5% CO₂ im sterilen Inkubator. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die entstandenen Zellkolonien im Lichtmikroskop anhand ihrer Morphologie charakterisiert und ausgezählt. Dabei wurden zwischen granulozytären/monozytären Kolonien CFU-GM (engl. *colony forming unit - granulocyte macrophage*), die erythroiden Kolonien BFU-E (engl. *burst forming unit - erythrocyte*) und die CFU-GEMM (engl. *colony forming unit - granulocyte, erythrocyte, macrophage, megacaryocyte*), die Zellen aller drei Blutzellreihen, differenziert.

2.3.2.3. RNS-Extraktion

Nach Aufreinigung der eosinophilen Granulozyten mittels CD-16 MACS-Separation wurden die Zellen in 1000µl TRIzol Reagent gegeben und für 3 Minuten lysiert. 200µl Trichlormethan/Chloroform wurden hinzugegeben, die Probe für 30 Sekunden geschüttelt und anschließend 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 21.000 x g bei 4°C, wurde die durchsichtige wässrige obere Phase abgenommen und in einem Verhältnis von 1:1 mit 70% Ethanol verdünnt. Im Anschluss daran wurde das Lysat mit Hilfe eines Säulensystems des NucleoSpin RNA Extraction Kits gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Nach Resuspension der RNS in 30µl Nuklease freiem Wasser wurde die RNS-Konzentration und -Reinheit optisch mittels Nanodrop bestimmt.

2.3.2.4. cDNS Synthese mittels reverser Transkription

Je nach Konzentration der zuvor isolierten RNS, wurde für die cDNS-Synthese mit dem QuantiTec Reverse Transcription Kit mit einer totalen RNS-Menge von 1µg, 500ng oder 250ng gemäß Herstellerprotokoll weitergearbeitet. Nach einer Volumenanpassung auf 12µl mit Nuklease freiem Wasser, wurde restliche verbleibende genomische DNS mittels 2µl gDNA Whipeout Buffer bei einer Inkubation von 42°C für 2 Minuten deletiert. Nach anschließender Zugabe von 1µl Primer-Mix, 4µl Reverse Transkriptase Puffer und 1µl reverser Transkriptase, wurde die cDNS-Synthese in einem Thermocycler für 15 Minuten bei 42°C gestartet. Durch eine weitere Inkubationszeit für 3 Minuten bei 95°C wurde die reverse Transkriptase im Anschluss inaktiviert. Es folgte eine Verdünnung, je nach RNS-Konzentration, mit Nuklease freiem Wasser im Verhältnis 1:10, 1:5 oder 1:25 und eine Lagerung der synthetisierten cDNS bei -20°C zur weiteren Stabilisation.

2.3.2.5. Auswahl der Primer mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Primer für die Messung von RNS-Level von intrazellulären BCL-2 Proteinen (siehe **Kapitel 2.1.6**) wurden eigenständig entwickelt und von Sigma Aldrich erworben. Grundlage dafür waren die Genomdaten der Onlinedatenbank „Ensembl Genome Browser“¹ [111]. Die Primerentwicklung erfolgte mit dem Onlinewerkzeug „Primer3Plus“² [112] und eine anschließende Qualitätsüberprüfung mit Hilfe der Werkzeuge „Multiple Primer Analyzer“ (Thermo Fisher) und „UCSC In-Silico PCR“³. Primersequenzen für HPRT, MORRBID

¹ Aufrufbar unter <http://www.ensembl.org/index.html>; letzter Zugriff 27.12.2021

² Aufrufbar unter <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>; letzter Zugriff 27.12.2021

³ Aufrufbar unter <http://rohsdb.cmb.usc.edu/GBshape/cgi-bin/hgPcr>; letzter Zugriff 27.12.2021

sowie auch BIM wurden aus der Publikation von Kotzin et al. [107] übernommen und von Sigma Aldrich erworben.

Die Primer wurden gemäß des Produktdatenblatts auf eine Konzentration von 100µM angepasst und in Nuklease freiem Wasser gelöst. Zur Verifikation der Primerspezifität wurde eine Polymerase-Kettenreaktion mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurde 250µg cDNS der Zelllinie HL-60 bzw. KG-1 alpha mittels des Kitsystems GoTaq Green Master Mix gemäß Herstellerangaben in einem Thermocycler repliziert.

Zur Herstellung eines 1,3% Agarose-Gels wurden 2g Agarose mit 150ml TAE Puffer für 3 Minuten in der Mikrowelle erhitzt, mit 7,5µl SYBR Safe DNA Stain versetzt und in eine SDS Elektrophoresekammer gegossen. Nach Abkühlen und Aushärten der Masse wurden pro Geltasche 20µl des zuvor synthetisierten PCR-Produktes geladen. 1x TAE wurde als Laufpuffer verwendet. In ca. 60 bis 90 Minuten wurden bei einer Spannung von 100 Volt die DNS-Fragmente aufgetrennt. Als Referenz wurde je Agarosegel eine GeneRuler DNA Express Ladder in einem Ansatz mitgeführt.

Die Primer für die weiteren Echtzeit-PCR Experimente wurde anhand der Bandenqualität hinsichtlich Singularität und korrekter Lokalisation ausgewählt. Zum Vergleich dazu diente das mitgelieferte Produktdatenblatt von Sigma Aldrich

2.3.2.6. Quantitative Echtzeit-PCR

Um die in **Kapitel 2.1.6** aufgelisteten mRNA Abschnitte in gesunden humanen Eosinophilen und in Eosinophilen von Patient*innen mit Hypereosinophilie zu quantifizieren, wurde quantitative Echtzeit-PCR angewendet. Hierzu wurden für jeden Experimentalansatz ein Mastermix aus jeweils 0,3µl Primer (vorwärts), 0,3µl Primer (rückwärts), 1,4µl Nuklease-freies Wasser und 5µl GoTaq qPCR Master Mix erstellt und in eine 96-well LightCycler Platte vorgelegt. Im Anschluss wurde für jeden Ansatz 3µl aufgereinigte cDNS (siehe **Kapitel 2.3.2.4**) hinzugefügt. Um die Vergleichbarkeit unter den Untersuchungen zu gewährleisten, wurde das Haushaltsgen HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) und die Zelllinien HL-60 und KG-1 Alpha als Referenzen mitgeführt.

Die Quantifizierung der Nukleinsäuren erfolgte durch Fluoreszenzmessung mit Hilfe des LightCycler 480 Instrument II. Dabei wurde die Polymerase-Kettenreaktion mit einer Inkubation bei 95°C für 2 Minuten gestartet und für 45 Zyklen, mit je 5 Sekunden bei 95°C zur Denaturierung und je 30 Sekunden bei 60°C zur Anlagerung der Primer und Amplifikation, durchgeführt. Gemessen wurde dabei der Ct-Wert (für engl. *threshold cycle*), der

den Teil der gemessenen Kurve beschreibt, in dem die Fluoreszenz das erste Mal exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt.

Zur relativen Quantifizierung der gemessenen Genexpressionslevel wurde die $\Delta\Delta Ct$ -Methode [113] mit folgender Formel verwendet:

$$n - \text{fache Expression (Zielgen zu Kontrollgen)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Dabei wurden als erstes die Ct-Werte des Zielgens und des Haushaltsgens (hier HPRT) subtrahiert und im Anschluss die Differenzen zu einer Kontrollgruppe (hier die Zelllinien HL-60 bzw. KG-1 Alpha) gebildet.

2.3.3. Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde eine durchflusszytometrische Methode mit 7-amino-actinomycin D (7AAD) und Annexin A5 gewählt. Annexin A5 ist ein Protein, das spezifisch an Phosphatidylserin binden kann. Dieses ist in gesunden, viablen Zellen an der zytoplasmatischen Plasmamembran lokalisiert, kommt in apoptotischen Zellen allerdings auch auf der äußeren Plasmamembran vor und kann somit von Annexin A5 als Apoptosemarker gebunden und zytometrisch gemessen werden. Das fluoreszierende Peptid und DNA-Interkalanz 7AAD hingegen kann ausschließlich in tote oder spät-apoptotische Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen und dient durchflusszytometrisch als weiterer Zelltod-Marker. Durch die Kombination der beiden Methoden und Farbstoffe kann folglich zwischen lebenden (negativ für Annexin A5 und 7AAD), früh-apoptotischen (positiv für Annexin A5 und negativ für 7AAD) und spät-apoptotischen (positiv für Annexin A5 und 7AAD) Zellen differenziert werden (siehe **Abbildung 7**).

Die zu untersuchenden Zellen (z.B. nach 72h Behandlung mit einem BH3-Mimetikum) wurden für den Assay jeweils in FACS-Röhrchen überführt und mit 1x DPBS gewaschen. Zur Untersuchung von eosinophilen Granulozyten aus peripherem Blut oder Knochenmark wurde anschließend mit 5 μ l APC-konjugiertem Siglec-8 Antikörper und 1 μ l FcR-Block für 10min bei 4°C inkubiert. Für die Analyse von Progenitorzellen aus Knochenmark wurde eine Färbung mit 2 μ l APC-konjugiertem CD45, 2 μ l eFluor 450-konjugiertem CD34 und 1 μ l FcR-Block für 30min bei 4°C gewählt. Nach dem Waschen mit Annexin-5A-Bindungspuffer wurden die Zellen für weitere 10min mit 3,2 μ l FITC-konjugiertem Annexin 5A bei Raumtemperatur inkubiert. Circa 2min vor der durchflusszytometrischen Analyse wurde 5 μ l 7AAD hinzugegeben.

Die Durchflusszytometrie erfolgte an einem FACS Canto II mit der Software BD FACS-Diva, die Analyse mithilfe des Programms FlowJo.

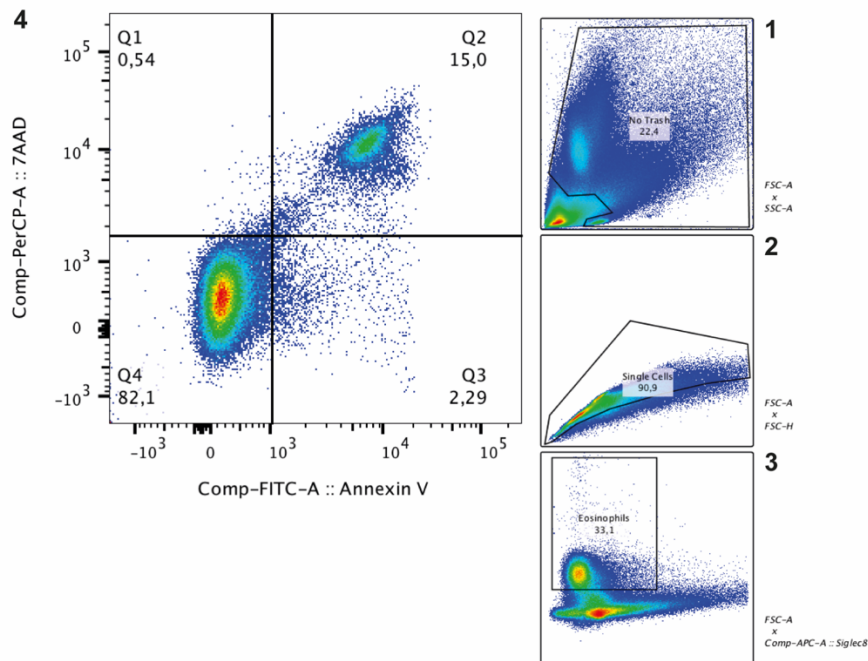


Abbildung 7: Beispielhaftes Gating der durchflusszytometrischen Viabilitätsanalyse. Nach dem Ausschluss von Zellresten (Gate 1 und 2) wurden auf Siglec-8 positive eosinophile Granulozyten (Gate 3) gated. Die Zelltodanalyse erfolgte mittels Annexin V und 7AAD. Viable Zellen wurden als Annexin V und 7AAD negativ definiert (Gate 4, Quadrant Q4).

2.3.4. Interleukin-5 Messung mittels ELISA

Zur Bestimmung des IL5-Spiegels im peripheren Blut der Proband*innen und der gesunden Kontrollproband*innen wurde das aufbereitete Blutplasma (siehe **Kapitel 2.3.1.2**) mit Hilfe eines *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) Kit-Systems untersucht. Dabei wurde jeweils 100µl Probenmaterial in Duplikaten und ein mitgeführter IL5 Standard auf einer 48-well Platte gemäß Herstellerangaben präpariert. Die Messung der optischen Extinktion erfolgte in einem GloMax® Discover Microplate Reader.

2.4. Statistische Auswertung

Analysen zur deskriptiven Statistik wurden für diese Arbeit mit IBM SPSS Statistics 25 durchgeführt. Die konfirmatorische Datenanalyse erfolgte mit GraphPad Prism 7.0e. Die durchgeführten statistischen Tests sind in dieser Dissertation jeweils in den Abbildungslegenden angegeben. Die *p*-Werte wurden nicht auf multiples Testen korrigiert, sind zweiseitig und haben ein Signifikanzniveau von 0,05.

3. Ergebnisse

3.1. Genexpression zentraler BCL-2 Proteine in eosinophilen Granulozyten

3.1.1. Die Genexpressionslevel von Morrbid und BIM unterscheiden sich nicht zwischen aberranten und gesunden eosinophilen Granulozyten

In einem kürzlich veröffentlichten Artikel zeigten Kotzin et al. [107], dass die *long non-coding RNA* (engl. lange nicht-kodierende RNA) Morrbid die Lebensdauer von eosinophilen Granulozyten entscheidend mitbestimmt (siehe **Kapitel 1.2.4**). Die Autoren stellten mit ihren Daten die Hypothese auf, dass Hypereosinophilie bei Patient*innen auf eine apoptotische Resistenz durch Hochregulation von Morrbid und Verlust von BIM zurückzuführen sein könnte [107]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden beide Faktoren in aufgereinigten eosinophilen Granulozyten von kranken und gesunden Spender*innen untersucht. Überraschenderweise konnten bei der Analyse der Patientenkohorte dieser Dissertation (siehe **Tabelle 4, Kapitel 2.2.2**), die im Umfang dem Kollektiv von Kotzin et al. entspricht, keine Korrelationen zwischen Krankheitsstatus (gesund / Eosinophilie), BIM oder Morrbid ermittelt werden (siehe **Abbildung 8**). Lediglich die zwei Patient*innen ID #22 (MLN-Eo) und ID #14 (HES) zeigten signifikant erhöhte Morrbid-Expressionslevel (siehe **Abbildung 8**). Darüber hinaus konnte statt einer antagonistischen Korrelation eine stark positive Korrelation zwischen BIM und der *long non-coding RNA* Morrbid gemessen werden (Pearson $r = 0,6221$, $p = 0,0002$; siehe **Abbildung 8c**). Bedeutsam ist, dass für die durchgeführte Studie die exakt gleichen Primer (siehe **Kapitel 2.1.6**) wie in der Studie von Kotzin et al. [107] verwendet wurden.

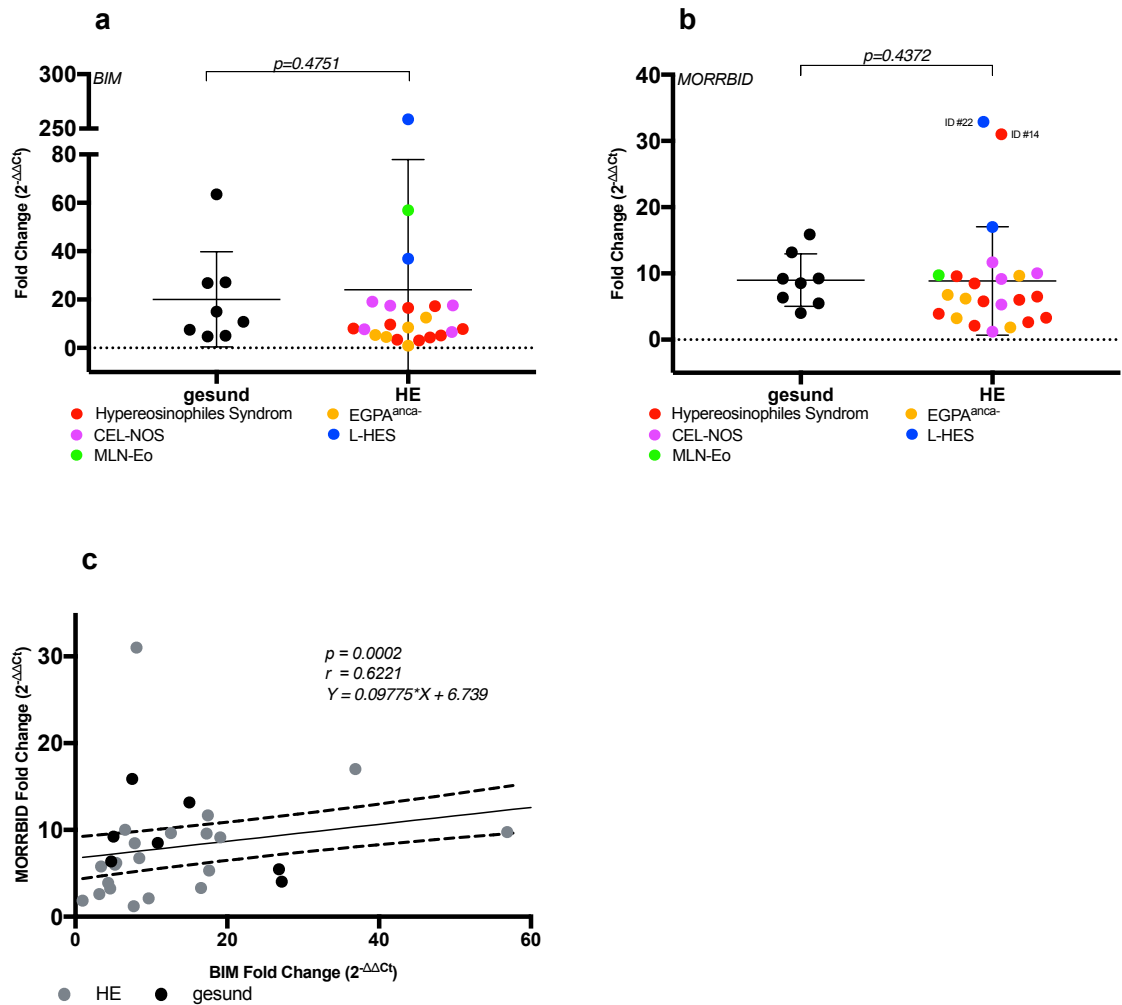


Abbildung 8: Genexpression von BIM und MORRBID in primären humanen eosinophilen Granulozyten. Die Expressionslevel wurden mittels RT-qPCR in aufgereinigten eosinophilen Granulozyten von gesunden Proband*innen und Patient*innen mit Hypereosinophilie gemessen, alle in Duplikaten. Zur Analyse wurde die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode verwendet. Ausgangswerte mit einer Standardabweichung (SD) $\geq 0,5$ zwischen den Duplikaten wurden aus Qualitätsgründen von der Analyse ausgeschlossen. In allen Analysen wurde die Genexpression auf das Housekeeping-Gen HPRT und die HL-60-Zelllinie normalisiert. (a) BIM wurde in 8 gesunden Kontrollen und 22 Patientenproben gemessen (HE; HES n=9; L-HES n=2; MLN-Eo n=1; CEL-NOS n=5; EGPA^{anca-} n=5), es wurde ein Mann-Whitney-Test verwendet, der p-Wert ist angegeben. Die Daten werden mit Mittelwert und Standardabweichung gezeigt. (b) Morrbid wurde in 8 gesunden Kontrollen und 23 Patientenproben gemessen (HE; HES n=10; L-HES n=2; MLN-Eo n=1; CEL-NOS n=5; EGPA^{anca-} n=5), es wurde ein Mann-Whitney-Test verwendet, der p-Wert ist angegeben. Die Daten sind mit Mittelwert und Standardabweichung gezeigt. (c) Für die Korrelationsanalyse von BIM / Morrbid bei allen Eosinophilen (gesund und aberrant) wurde die Korrelationsstärke mittels einer Pearson-Korrelation (Pearson $r = 0,6221$) berechnet und der funktionelle Zusammenhang mittels linearer Regression (wie angegeben) beschrieben, der p-Wert ist in der Grafik angegeben. Die gestrichelten Linien zeigen das 95%-Konfidenzintervall der linearen Regression.

Zudem hatte der eosinophilenstimulierende Faktor IL5, der zu Studienbeginn photometrisch mittels ELISA im Patientenplasma (peripheres Blut) gemessen wurde, keinen signifikanten Einfluss auf die Morrbid- und BIM-Genexpression (siehe **Abbildung 9**).

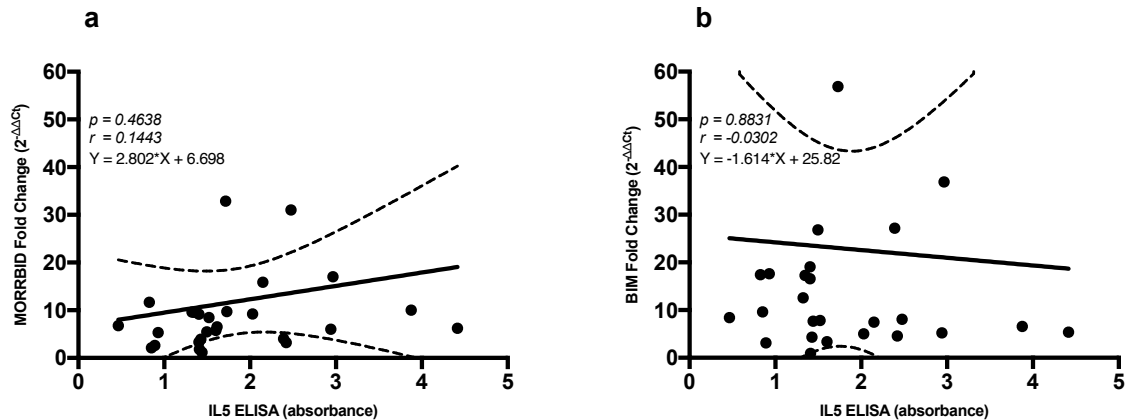


Abbildung 9: MORRBID und BIM Genexpression korreliert nicht mit den Interleukin-5 Plasmaspiegel im Patientenblut. Genexpressionsdaten von (a) MORRBID (n=28) und (b) BIM (n=26) in eosinophilen Granulozyten (siehe **Abbildung 8**) wurden durch Pearson-Korrelation mit IL-5 in den Blutplasmaspiegeln zum Zeitpunkt der Probenahme korreliert. Der funktionale Zusammenhang wurde mit linearer Regression beschrieben. Pearson r, p-Werte und lineare Regressionsterme sind angegeben. Die gestrichelten Linien zeigen das 95%-Konfidenzintervall der linearen Regression.

3.1.2. Eosinophile Granulozyten von Patient*innen mit Hypereosinophilie zeigen einen fast vollständigen Verlust des proapoptotischen PUMA

Zunächst erfolgte eine Analyse der Genexpressionslevel proapoptotischer BCL-2-Proteine mittels quantitativer Echtzeit-PCR. BAX und BAK, von denen bekannt ist, dass sie eine zentrale Rolle bei der Apoptose von eosinophilen Granulozyten spielen [114, 115], unterschieden sich in ihren Genexpressionslevel nicht zwischen gesunden und aberranten eosinophilen Granulozyten (siehe **Abbildung 10a,b**). In aufgereinigten Eosinophilen von Patient*innen mit Chronischer Eosinophilenleukämie (CEL-NOS) konnte jedoch eine erhöhte BAX-Expression gemessen werden (siehe **Abbildung 10a**, p=0,0380). Sowohl BAK als auch BAX werden physiologischerweise durch *BH3-only* Proteine wie BIM, PUMA und NOXA aktiviert und direkt durch überlebensfördernde BCL-2-Proteine gehemmt (siehe **Kapitel 1.2.1**). Während sich die Genexpression der proapoptotischen BCL-2-Proteine NOXA und BIM zwischen den beiden Kohorten nicht unterscheiden (siehe **Abbildung 8a** und **Abbildung 10d**), konnte in der Patientenkohorte ein fast vollständiger Verlust der PUMA-mRNA (siehe **Abbildung 10c**, p=0,0010) gemessen werden. Diese Daten deuten die Daten darauf hin, dass eosinophile Granulozyten von Patient*innen mit Hypereosinophilie im Vergleich zu Eosinophilen von gesunden Spender*innen nicht in der Lage sind, eine PUMA-induzierte Apoptose einzuleiten.

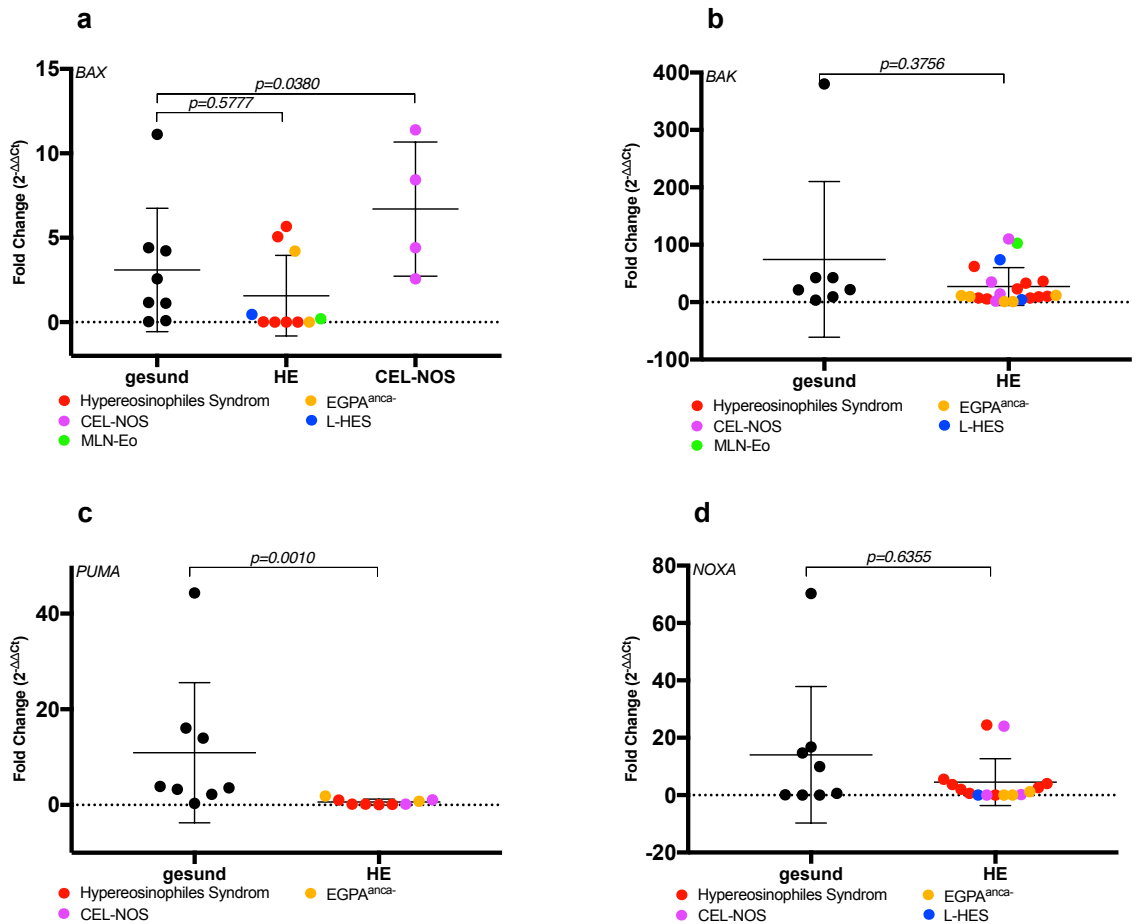


Abbildung 10: Genexpression der wichtigsten proapoptischen BCL-2 Proteine in primären humanen eosinophilen Granulozyten. Die Genexpressionslevel wurden in Duplikaten mittels RT-qPCR in aufgereinigten eosinophilen Granulozyten von gesunden Proband*innen und Patient*innen mit Hypereosinophilie gemessen. Zur Analyse wurde die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode verwendet, Ausgangswerte mit $SD \geq 0,5$ zwischen den Duplikaten wurden aus Qualitätsgründen von der Analyse ausgeschlossen. In allen Analysen wurde die Fold-Genexpression auf das Housekeeping-Gen HPRT und die HL-60-Zelllinie normalisiert. Die Daten sind mit dem Mittelwert \pm SD gezeigt. (a) BAX wurde in 8 gesunden Kontrollen und 14 Patientenproben gemessen (HE; HES n=6; L-HES n=1; MLN-Eo n=1; CEL-NOS n=4; EGPA^{anca-} n=2). Die Daten wurden speziell auf Unterschiede zwischen der gesunden Gruppe und den Patient*innen mit CEL-NOS getestet. Dabei wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit paarweisem Post-hoc-Vergleich angewendet, die p-Werte sind angegeben. (b) BAK wurde in 7 gesunden Kontrollen und 21 Patientenproben gemessen (HE; HES n=9; L-HES n=2; MLN-Eo n=1; CEL-NOS n=4; EGPA^{anca-} n=5). Der Mann-Whitney-Test wurde angewandt, der p-Wert ist in der Grafik angegeben. (c) PUMA wurde in 8 gesunden Kontrollen und 9 Patientenproben (HE; HES n=5; CEL-NOS n=2; EGPA^{anca-} n=2) gemessen. Der Mann-Whitney-Test wurde verwendet, der p-Wert ist in der Grafik angegeben. (d) NOXA wurde in 8 gesunden Kontrollen und 15 Patientenproben (HE; HES n=8; L-HES n=1; CEL-NOS n=3; EGPA^{anca-} n=3) gemessen. Hier wurde die Analyse der Genexpression auf das Housekeeping-Gen HPRT und die KG1-alpha-Zelllinie normalisiert. Ein Mann-Whitney-Test wurde verwendet, der p-Wert ist in der Grafik angegeben.

3.1.3. Die Genexpression des antiapoptischen BCL-2 ist in Eosinophilen gesunder Spender*innen signifikant höher als in der Patientenkohorte

Betrachtet man die wichtigsten antiapoptischen BCL-2-Proteine BCL-2, BCL-xL, BCL-w und MCL1 (siehe **Abbildung 11**), kann nur BCL-2 selbst gesunde von „aberranten“ eosinophilen Granulozyten unterscheiden. Während BCL-xL, BCL-w und MCL1 ähnliche Genexpressionslevel in eosinophilen Granulozyten von gesunden Spender*innen und der Patientenkohorte aufweisen, ist die BCL-2 Genexpression in Eosinophilen in der gesunden Kontrollkohorte viermal höher als in den Patientenproben (siehe **Abbildung 11a**). Zudem sind die BCL-2 Expressionslevel in der Kontrollkohorte weit gestreut

(Mittelwert 10,78, Standardabweichung 7,27), aber niedrig und geclustert in der Patientenkohorte (Mittelwert 2,69, Standardabweichung 2,55). Die Genexpressionslevel von BCL-xL unterscheiden sich nicht zwischen den beiden Kohorten und sind eng geclustert (gesund vs. HE; Mittelwerte 11,27 vs. 11,31, Standardabweichung 12,09 vs 14,83, siehe **Abbildung 11b**). Lediglich ein Patient mit hypereosinophilem Syndrom (HES) zeigte besonders hohe BCL-xL Level ($y=58,49$), ein klinischer Zusammenhang bzw. zu anderen Ausreißern in anderen Analysen konnte nicht gefunden werden (siehe **Abbildung 11b**). Auch das überlebensfördernde BCL-w kann nicht zwischen den beiden Kohorten unterscheiden. Auch hier sind die Genexpressionslevel gesunder eosinophiler Granulozyten weit gestreut, während das Patientenmaterial eher niedrige, eng geclusterte RNA-Expressionslevel aufweisen (gesund vs. HE; Mittelwerte 1,54 vs. 0,21, Standardabweichung 2,96 vs. 0,21, siehe **Abbildung 11c**). Für MCL1 zeigen sich in den eosinophilen Granulozyten beider Kohorten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Genexpression (**Abbildung 11d**).

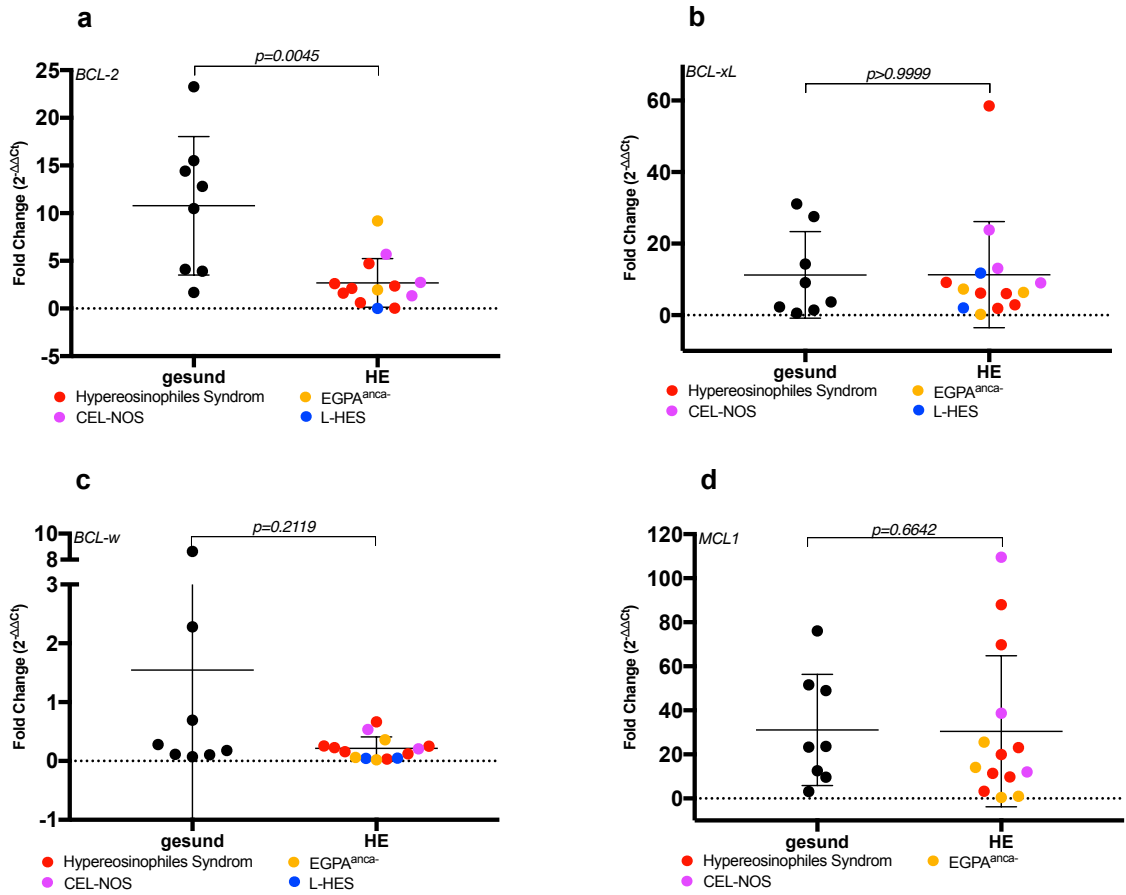


Abbildung 11: Genexpression der wichtigsten antiapoptotischen BCL-2 Proteine in primären humanen eosinophilen Granulozyten. Die Genexpressionslevel wurden in Duplikaten mittels RT-qPCR in aufgereinigten eosinophilen Granulozyten von gesunden Proband*innen und Patient*innen mit Hyper eosinophilie gemessen. Zur Analyse wurde die 2^{ΔΔCt}-Methode verwendet, Ausgangswerte mit SD $\geq 0,5$ zwischen den Duplikaten wurden aus Qualitätsgründen von der Analyse ausgeschlossen. In allen Analysen wurde die Fold-Genexpression auf das Housekeeping-Gen HPRT und die HL-60-Zelllinie normalisiert. Die Daten sind mit dem Mittelwert \pm SD gezeigt. a) BCL-2 wurde in 8 gesunden Kontrollen und 13 Patientenproben gemessen (HE; HES n=7; L-HES n=1; CEL-NOS n=3; EGPA^{ancla-} n=2). Dabei wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, der p-Wert ist angegeben. (b) BCL-xL wurde in 8 gesunden Kontrollen und 14 Patientenproben gemessen (HE; HES n=6; L-HES n=2; CEL-NOS n=3; EGPA^{ancla-} n=3). Ein Mann-Whitney-Test wurde verwendet, der p-Wert ist in der Grafik angegeben. (c) BCL-w wurde in 8 gesunden Kontrollen und 14 Patientenproben gemessen (HE; HES n=7; L-HES n=2; CEL-NOS n=2; EGPA^{ancla-} n=3). Der Mann-Whitney-Test wurde verwendet, der p-Wert ist angegeben. (d) MCL1 wurde in 8 gesunden Kontrollen und 14 Patientenproben gemessen (HE; HES n=7; CEL-NOS n=3; EGPA^{ancla-} n=4). Der Mann-Whitney-Test wurde verwendet, der p-Wert ist in der Grafik angegeben.

3.2. Zelltodinduktion in eosinophilen Granulozyten und myeloischen Vorläuferzellen mittels BH3-Mimetika

Neben der Messung der Genexpressionslevel der BCL-2 Proteine in eosinophilen Granulozyten erfolgte in einem *in vitro* Setting eine Analyse der Suszeptibilität der primären humanen Patientenproben (eosinophile Granulozyten aus peripherem Blut und myeloische Vorläuferzellen aus Knochenmark) gegenüber BCL-2-Proteinhemmung mittels BH3-Mimetika. Da das mediane Überleben von eosinophilen Granulozyten *in vivo* circa zwei bis fünf Tage beträgt, *ex vivo* jedoch bis zu 14 [106], wurde nach Vorversuchen zur Viabilität ein Analysezeitraum von 72 Stunden gewählt. Auch für die BMMC wurde analog zu Vorstudien der Arbeitsgruppe der Analysezeitpunkt auf 72 Stunden festgelegt [15,

104, 116]. Das Zellmaterial wurde dabei wie in den **Kapiteln 2.3.1** und **2.3.2.1** beschrieben in Kultur genommen, nach 72h *in vitro* Inkubationszeit wurde die Zellviabilität wie in **Kapitel 2.3.3** dargestellt gemessen. Die Patientenproben wurden nur dann in die folgenden Analysen miteingeschlossen, wenn die absolute Viabilität der DMSO Lösungsmittelkontrolle über 90% lag, um Effekte physiologischer apoptotischer Prozesse zu normalisieren. Die applizierten BH3-Mimetika wurden in Vorversuchen bzw. analog zu bereits publizierten Veröffentlichungen [15, 104, 116] auf gesunden Knochenmarkszellen (BMMC) auf eine nicht-zytotoxische Konzentration titriert und final in einer Konzentration von jeweils 1µM in der Zellkultur angewandt.

3.2.1. Die Viabilität eosinophiler Granulozyten nach BCL-2-Proteinblockade mit BH3-Mimetika ist unabhängig vom Interleukin-5 Plasmaspiegel.

Da das Überleben eosinophiler Granulozyten *in vivo* und *in vitro* stark vom Zytokin Interleukin-5 abhängt, wurde das Zellkulturmedium mit 10 ng/ml IL5 gesättigt um einen systemischen Bias durch Zytokindeprivation zu verhindern. Auch der Einfluss patientenindividueller Interleukin-5-Plasmaspiegel zum Zeitpunkt der Probenentnahme auf die spätere Viabilitätsanalyse konnte ausgeschlossen werden (siehe **Abbildung 12**). So zeigte das Ansprechen der eosinophilen Granulozyten auf die *in vitro* Behandlung mit den BH3-Mimetika ABT-199, ABT-737, WEHI-539 und S63845 keine Korrelationen mit dem IL-5-Plasmaspiegel im Patientenblut (siehe **Abbildung 12**).

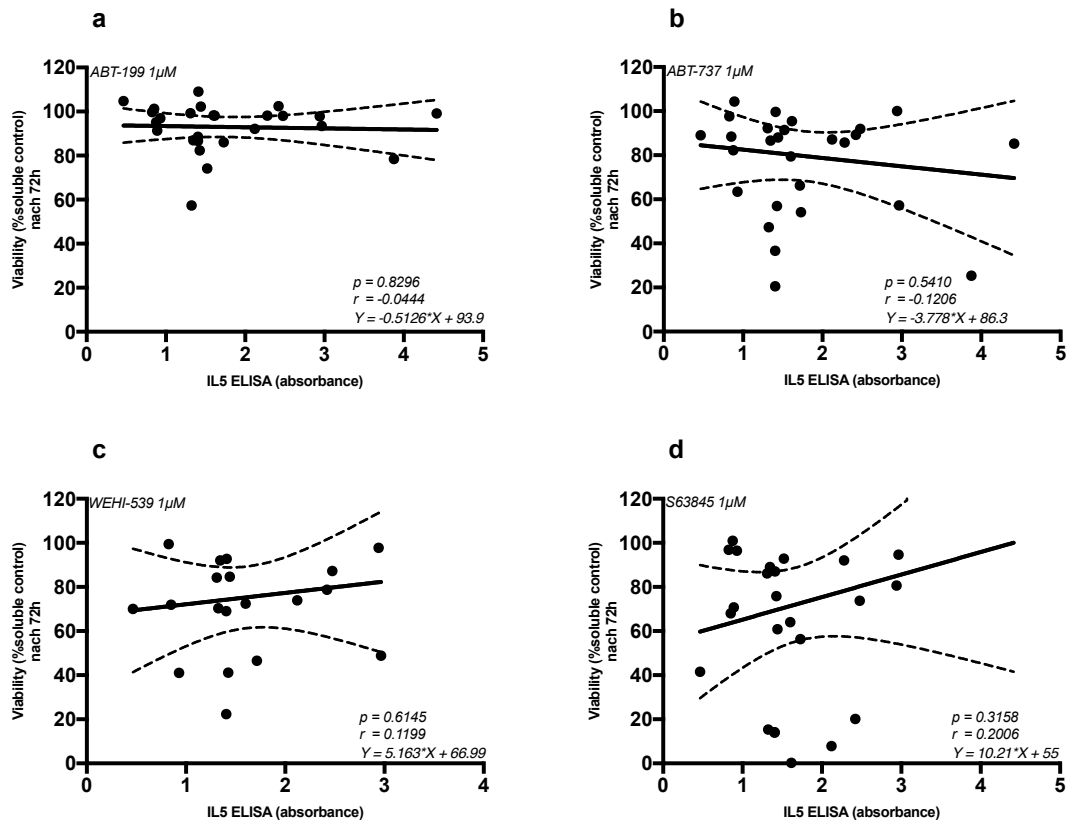


Abbildung 12: Das Ansprechen der eosinophilen Granulozyten auf *in vitro* Behandlung mit BH3-Mimetika korreliert nicht mit dem Interleukin-5 Plasmaspiegel im Patient*innenblut. Der IL5-Plasmaspiegel zu Studienbeginn beeinflusst nicht die *in vitro* Inhibition wichtiger BCL-2 Proteine in der 72h Viabilitätsanalyse. Daten zur Viabilität aberranter eosinophiler Granulozyten von Patient*innen mit Hypereosinophilie (siehe **Abbildung 13**) wurden mittels Pearson-Korrelation mit IL5 Blutplasmaspiegeln zum Zeitpunkt der Probenentnahme korreliert, der funktionale Zusammenhang wurde mittels linearer Regression beschrieben. (a-d) zeigt den Zusammenhang zwischen IL5-Extinktionswerten und der Zellviabilität (in % zur DMSO Kontrolle) eosinophiler Granulozyten nach 72-stündiger Behandlung mit ABT-199 (n=26), ABT-737 (n=28), S63845 (n=29) und WEHI-539 (n=20). Pearson r, p-Werte und Regressionsgleichungen sind in der Grafik angegeben. Die gestrichelten Linien zeigen das 95%-Konfidenzintervall der linearen Regression.

3.2.2. Eosinophile Granulozyten von Patient*innen mit Hypereosinophilie sind resistent gegenüber Zelltodinduktion mit BH3-Mimetika

Eosinophile Granulozyten gesunder Blutspender*innen zeigten im Rahmen dieser Studie eine deutlich reduzierte Zellviabilität nach 72-stündiger *in vitro* Behandlung mit BH3-Mimetika. Während die Inhibition von BCL-2 mit ABT-199 und die Hemmung von BCL-xL mit WEHI-539 eine eher geringere Auswirkung auf die Viabilität der Eosinophilen hatten (ABT-199 und WEHI-539; Mittelwert 85% und 67%, siehe **Abbildung 13a,c**), zeigte die Blockade von MCL1 mit S63845 und Pan-BCL-2-Blockade mit ABT-737 (BCL-2, BCL-xL und BCL-w) größere Auswirkungen auf die Zellviabilität eosinophiler Granulozyten von gesunden Spender*innen (S63845 und ABT-737; Mittelwert 59% und 52%, siehe **Abbildung 13b,d**). Bei einem gesunden Probanden führte die Applikation von 1 μ M ABT-737 sogar zur Eradikation der gesamten Eosinophilenpopulation *in vitro* (siehe **Abbildung 13b**). Interessanterweise konnte in den aus Patientenproben isolierten eosinophilen Granulozyten ein anderes Ansprechen auf BH3-Mimetika beobachtet werden. In den

meisten *in vitro* Behandlungskohorten war die Zellviabilität nach 72-stündiger Inkubation sogar höher als in der gesunden Kontrollpopulation.

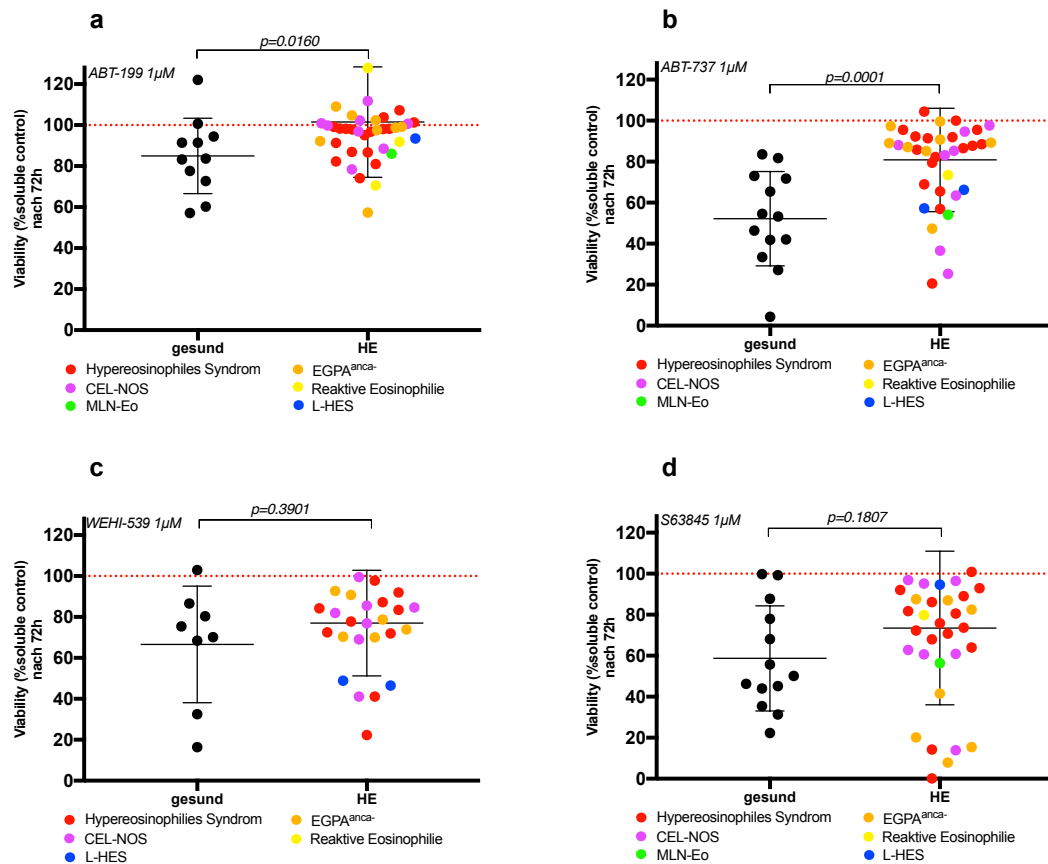


Abbildung 13: Aberrante eosinophile Granulozyten von Patient*innen mit Hyper eosinophilie sind resistenter gegenüber einer Apoptoseinduktion mit BH3-Mimetika im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Viable Granulozyten von gesunden Kontrollen und Patient*innen mit Hyper eosinophilie wurden 72h mit den angegebenen BH3-Mimetika und DMSO behandelt und im Anschluss mit Siglec 8 für die Durchflusszytometrie gefärbt. Die Viabilität der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von Annexin V und 7AAD gemessen und ist im Verhältnis (in %) zur DMSO-Kontrolle mit Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test, die p-Werte sind angegeben. (a) Granulozyten von 11 gesunden Kontrollen und 41 Patient*innen mit Hyper eosinophilie (HE; reaktive Eosinophilie n=3, HES n=18, L-HES n=2, MLN-Eo n=1, CEL-NOS n= 8, EGPA^{anca-}n=9) wurden für 72h mit ABT-199 behandelt. (b) Granulozyten von 13 gesunden Kontrollen und 38 Patient*innen mit Hyper eosinophilie (HE; reaktive Eosinophilie n=1, HES n=17, L-HES n=2, MLN-Eo n=1, CEL-NOS n= 8, EGPA^{anca-}n=9) wurden für 72h mit ABT-737 behandelt. (c) Granulozyten von 8 gesunden Kontrollen und 26 Patient*innen mit Hyper eosinophilie (HE; HES n=10, L-HES n=2, CEL-NOS n=7, EGPA^{anca-} n=7) wurden für 72h mit WEHI-539 behandelt. (d) Granulozyten von 13 gesunden Kontrollen und 35 Patient*innen mit Hyper eosinophilie (HE; reaktive Eosinophilie n=1, HES n=15, L-HES n=2, MLN-Eo n=1, CEL-NOS n= 7, EGPA^{anca-}n=9) wurden für 72h mit S63845 behandelt.

Bei *in vitro* Applikation von 1 μ M ABT-199 (siehe **Abbildung 13a**) und von 1 μ M ABT-737 (siehe **Abbildung 13b**) war die Zellviabilität signifikant höher als in der Kontrollgruppe (gesund vs. HE; 16 Prozentpunkte bei ABT-199, 28 Prozentpunkte bei ABT-737), unter der Applikation von ABT-737 zeigten insbesondere Patient*innen mit diagnostizierter EGPA^{anca-} kein Ansprechen auf BCL-2-Proteininhibition (siehe **Abbildung 14a**). In den anderen Diagnosegruppen (HES, CEL-NOS, MLN-Eo, reaktive Eosinophilie, L-HES) zeigte sich der Effekt der *in vitro* Behandlung mit ABT-737 auf die Zellviabilität weit gestreut. Auch die pharmakologische Inhibition von MCL1 mit dem BH3-Mimetikum S63845 führte zu sehr heterogenen Effekten auf die Zellviabilität eosinophiler

Granulozyten. Insgesamt zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Eosinophilen von gesunden Spender*innen und Patient*innen mit Hypereosinophilie (gesund vs. HE; Mittelwert 58,7% vs. 73,5%, Standardabweichung 25,6 Prozentpunkte vs. 37,5 Prozentpunkte; siehe **Abbildung 13d**). Auffällig ist jedoch auch, dass ein Teil des Patientenmaterials außergewöhnlich stark auf die *in vitro* Behandlung mit S63845 anspricht (siehe **Abbildung 14b**). Eine entsprechende Korrelation zwischen Ansprechen auf MCL1-Inhibition und Diagnose, klinischen Merkmalen, Vortherapie oder anderen Biomarkern konnte nicht ermittelt werden.

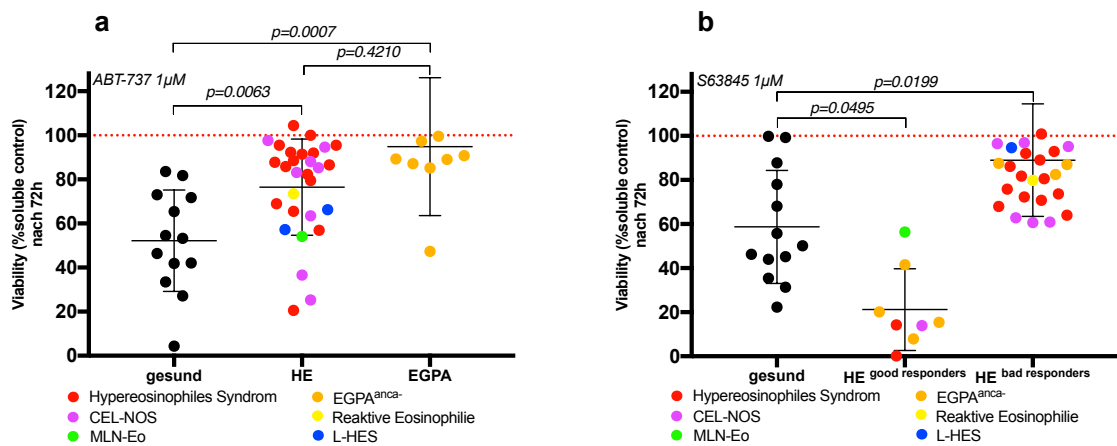


Abbildung 14: Aberrante Eosinophile von Patient*innen mit EGPA sind besonders resistent gegenüber Apoptoseinduktion mittels ABT-737, die Effekte der Apoptoseinduktion durch den MCL1-Inhibitor S63845 sind sehr variabel in eosinophilen Granulozyten. Viable Granulozyten von gesunden Kontrollen und Patient*innen mit Hypereosinophilie wurden für 72h mit den angegebenen BH3-Mimetika und DMSO behandelt und im Anschluss mit Siglec 8 für die Durchflusszytometrie gefärbt. Die Viabilität der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von Annexin V und 7AAD gemessen und ist im Verhältnis (in %) zur DMSO-Kontrolle mit Mittelwert ± Standardabweichung (SD) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und paarweisem post-hoc Vergleich, die p-Werte sind in der Grafik angegeben. (a) Granulozyten von 13 gesunden Kontrollen und von 38 Patient*innen mit Hypereosinophilie (HE; reaktive Eosinophilie n=1, HES n=17, L-HES n=2, MLN-Eo n=1, CEL-NOS n= 8, EGPA^{anca-} n=9) wurden für 72h mit ABT-737 behandelt. (b) Granulozyten von 13 gesunden Kontrollen und von 35 Patient*innen mit Eosinophilie (HE; reaktive Eosinophilie n=1, HES n=15, L-HES n=2, MLN-Eo n=1, CEL-NOS n= 7, EGPA^{anca-} n=9) wurden für 72h mit S63845 behandelt. Die analysierte Kohorte wurde entsprechend dem Ergebnis des 72h-Viabilitätstests unterteilt. Patient*innen mit gutem Ansprechen (good responders) wurden durch eine Viabilität < 60 %, Patient*innen mit schlechtem Ansprechen (bad responders) durch eine Viabilität > 60 % definiert.

Zudem konnte bestätigt werden, dass eine erhöhte BCL-2-Genexpression mit einem erhöhten Ansprechen auf BCL-2-Inhibition mittels ABT-199 (Venetoclax) einhergeht, was jedoch im Zusammenhang mit den zuvor gezeigten Daten keine (klinische) Relevanz für Patient*innen mit Hypereosinophilie hat (siehe **Abbildung 12**).

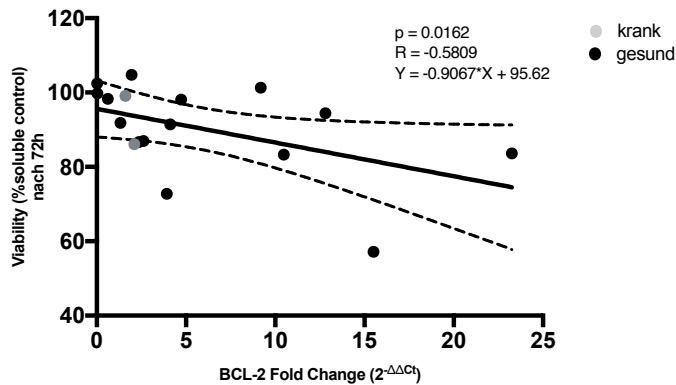


Abbildung 15: Erhöhte BCL-2-Genexpression geht mit einem erhöhten Ansprechen auf BCL-2 Inhibition einher. Korrelation der Viabilitätsdaten von eosinophilen Granulozyten nach 72h Behandlung mit ABT-199 (siehe **Abbildung 13**) und der BCL-2 Genexpression in eosinophilen Granulozyten (siehe **Abbildung 11**). Gezeigt ist eine Spearman-Korrelation mit $R = -0,5809$, $p=0,0162$ mit einer linearen Regressionsanalyse. Die gestrichelten Linien zeigen das 95%-Konfidenzintervall der linearen Regression.

3.2.3. Der MCL1-Inhibitor S63845 induziert selektiv Apoptose in myeloischen Vorläuferzellen von Patient*innen mit Hypereosinophilie unter Schonung der gesunden Hämatopoese

Während die Pathogenese der idiopathischen Hypereosinophilie und des Hypereosinophilen Syndroms weitgehend ungeklärt ist, sind bei der CEL-NOS und der MLN-Eo spezifische Aberrationen der myeloischen Vorläuferzelle krankheitsdefinierend (siehe **Kapitel 1.1.3**). Deshalb wurden im Rahmen dieser Dissertation auch die Effekte der BCL-2-Blockade auf myeloische Vorläuferzellen, die aus Knochenmark extrahiert und *in vitro* kultiviert wurden, analysiert. Dabei zeigten sich in allen Experimenten die $CD34^+/CD45^{dim}$ myeloischen Vorläuferzellen der gesunden Kontrollkohorte von der BCL-2-Inhibition mit BH3-Mimetika unbeeinflusst (alle Mittelwerte der Zellviabilität $>90\%$ mit Standardabweichung $<8\%$; siehe **Abbildung 16**). Myeloische Vorläuferzellen von Patient*innen mit Hypereosinophilie zeigten dahingegen ein stark variables Ansprechen auf die *in vitro* Behandlung mit ABT-199 (Mittelwert $86,9\%$, Standardabweichung $24,1\%$, siehe **Abbildung 16a**), ABT-737 (Mittelwert $74,0\%$, Standardabweichung $29,2\%$, siehe **Abbildung 16b**) und WEHI-539 (Mittelwert $86,1\%$, Standardabweichung $24,2\%$, siehe **Abbildung 16c**). Ein statistisch signifikanter Effekt konnte aber für diese drei Substanzen nicht nachgewiesen werden. Die MCL1-Blockade mit dem BH3-Mimetikum S63845 induzierte eine signifikante Reduktion der Zellviabilität (Mittelwert $58,9\%$, Standardabweichung $22,5\%$, siehe **Abbildung 16d**).

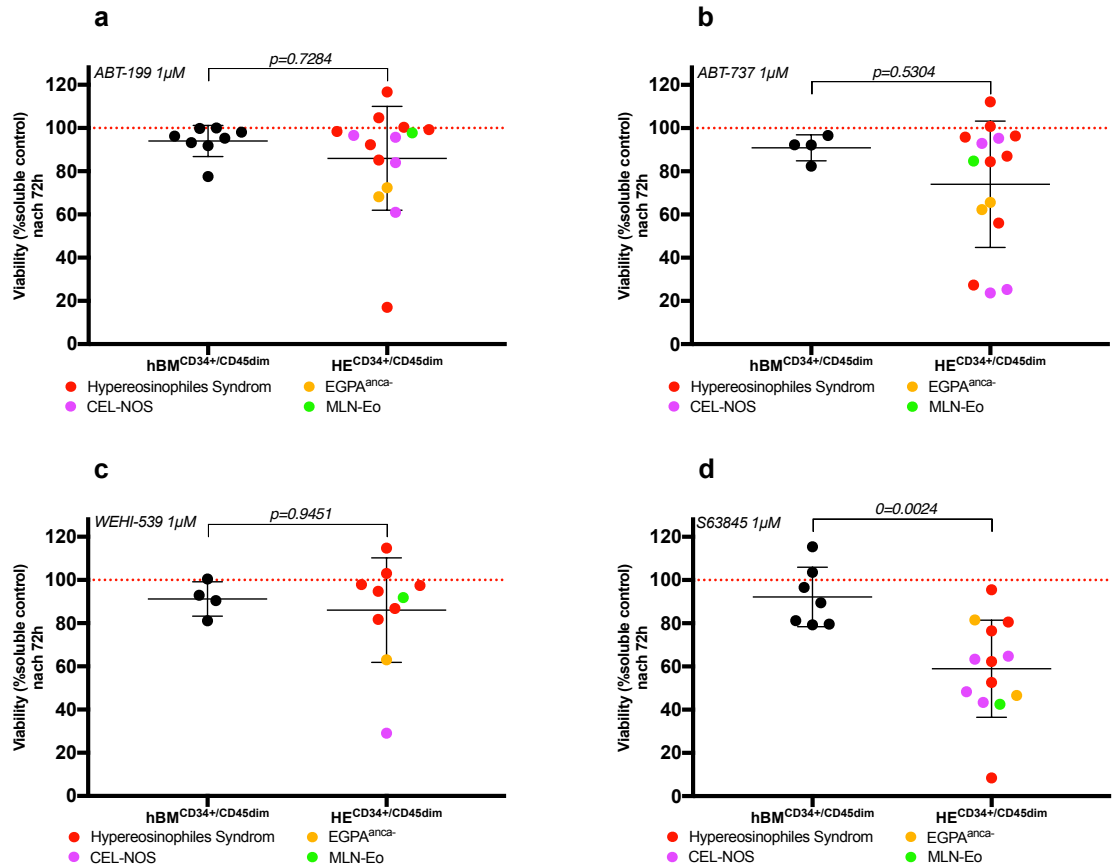


Abbildung 16: MCL1-Inhibition mit S63845 reduziert die Viabilität in primären myeloischen Vorläuferzellen. Die Viabilität von CD34⁺/CD45^{dim}-Vorläuferzellen bleibt von der *in vitro* Behandlung mit BH3-Mimetika unbeeinflusst, während die gezielte Inhibition von MCL1 mit S63845 die Viabilität der myeloischen Vorläuferzellen in Patient*innen mit Hypereosinophilie reduziert. Viable BMMCs von gesunden Kontrollen und Patient*innen mit Hypereosinophilie wurden für 72h mit den angegebenen BH3-Mimetika und DMSO behandelt und im Anschluss mit CD34 und CD45 für die Durchflusszytometrie gefärbt. Zur Analyse der myeloischen Vorläuferzellen wurde auf CD34⁺ und CD45^{dim} gated. Die Viabilität der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von Annexin V und 7AAD gemessen und ist im Verhältnis (in %) zur DMSO-Kontrolle mit Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test, die p-Werte sind in der Grafik angegeben. (a) BMMCs von 8 gesunden Kontrollen (hBM) und von 15 Patient*innen mit Hypereosinophilie (HE; HES n=8, CEL-NOS n=4, MLN-Eo n=1 und EGPA^{ancla}-n=2) wurden für 72h mit ABT-199 1 μ M behandelt. (b) BMMCs von 4 gesunden Kontrollen und von 15 Patient*innen mit Hypereosinophilie (HE; HES n=8, CEL-NOS n=4, MLN-Eo n=1 und EGPA^{ancla}-n=2) wurden für 72h mit ABT-737 behandelt. (c) BMMCs von 4 gesunden Kontrollen und von 10 Patient*innen mit Hypereosinophilie (HE; HES n=7, CEL-NOS n=1, MLN-Eo n=1 und EGPA^{ancla}-n=1) wurden für 72h mit WEHI-539 behandelt. (d) BMMCs von 7 gesunden Kontrollen und von 13 Patient*innen mit Hypereosinophilie (HE; HES n=6, CEL-NOS n=4, MLN-Eo n=1 und EGPA^{ancla}-n=2) wurden für 72h mit S63845 behandelt.

Interessanterweise zeigte sich das Ansprechen von S63845 verstärkt in den monoklonalen Formen der Hypereosinophilie wie der CEL-NOS und der MLN-Eo (Mittelwert 52,5%, Standardabweichung 10,9%, siehe **Abbildung 17**).

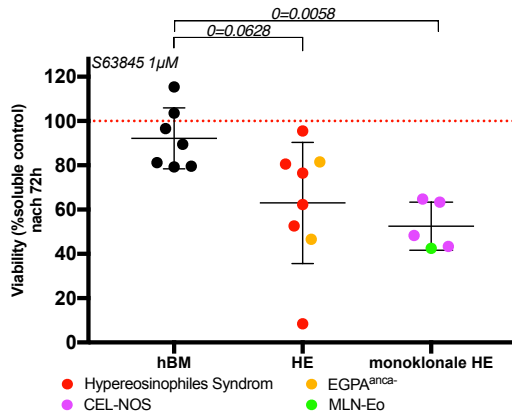


Abbildung 17: MCL1-Inhibition mit S63845 reduziert die Viabilität vor allem in primären myeloischen Vorläuferzellen in Patientenproben mit Eosinophilie monoklonalen Ursprungs. Gezeigt ist eine Subanalyse der Viabilitätsdaten aus **Abbildung 16d**. Für die statistische Analyse wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit paarweisem post-hoc Vergleich durchgeführt, die p-Werte sind in der Grafik angegeben.

Zudem wurde die Koloniebildungskapazität der myeloischen Vorläuferzellen nach 72-stündiger Behandlung mit dem BH3-Mimetikum S63845 mittels Methylcellulose-Test (siehe **Kapitel 2.3.2.2**) als Indikator für Langzeiteffekte bestimmt. In Übereinstimmung mit den Daten aus der durchflusszytometrischen Kurzeitanalyse (siehe **Abbildung 16**) zeigte sich auch hier die Wirkung von ABT-199, ABT-737 und WEHI-539 stark variabel, während die selektive Blockade von MCL1 eine langfristige Hemmwirkung auf die Koloniebildungskapazität hatte (siehe **Abbildung 18**). Zusammenfassend implizieren die gezeigten Daten, dass das BH3-Mimetikum S63845 selektiv auf „aberrante“ myeloische Vorläuferzellen wirkt ohne dabei die gesunde Hämatopoese zu schädigen.

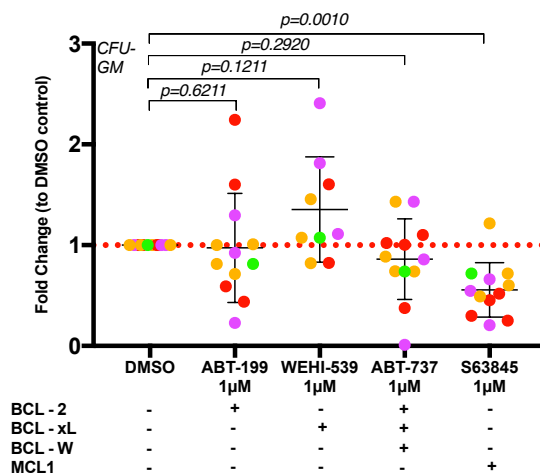


Abbildung 18: MCL1-Inhibition mit S63845 zeigt eine Langzeitwirkung auf myeloische Vorläuferzellen von Patient*innen mit Hypereosinophilie im Methylcellulose-Test. BMMCs von Patient*innen mit Hypereosinophilie wurden wie in **Kapitel 2.3.2.2** beschrieben in Duplikaten in mit Wachstumsfaktor angereicherter Methylcellulose nach 72 h Behandlung mit ABT-199 (n=12), WEHI-539 (n=9), ABT-737 (n=12), S63845 (n=12) und DMSO ausplattiert. Nach 14 Tagen wurde im Lichtmikroskop die Gesamtzahl von Granulozyten/Makrophagen koloniebildenden Einheiten (CFU-GM) ermittelt, der Mittelwert aus beiden Duplikaten wurde berechnet. Die Grafik zeigt die CFU-GM Koloniezahl nach Behandlung mit BH3-Mimetika im Verhältnis (in %) zur DMSO Kontrolle und ist mit Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Zur statistischen Auswertung wurde der Wilcoxon-Test verwendet, die p-Werte sind in der Grafik angegeben.

4. Diskussion

Für eine effektive Hämatopoese und Immunregulation ist es essenziell, dass sich insbesondere Zellen mit kurzer Lebensspanne wie eosinophile Granulozyten in Homöostase zwischen Zelltod und Zellproliferation befinden. Es besteht kaum Zweifel daran, dass die fehlerhafte Regulation der Apoptose von eosinophilen Granulozyten mit Eosinophilie einhergeht und damit eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von Erkrankungen mit Hypereosinophilie spielen könnte. Die Überwindung von Apoptoseresistenz durch die Blockade von antiapoptotischen BCL-2-Proteinen mittels BH3-Mimetika wie beispielsweise Venetoclax ist ein modernes und etabliertes Therapieprinzip in der Hämatologie. Einige Datensätze deuten auf einen relevanten Einfluss der Mitglieder der BCL-2-Familie auf das Überleben von eosinophilen Granulozyten hin (siehe **Kapitel 1.2.4**). In einem in *Nature* publizierten Bericht von Kotzin et al. wurde berichtet, dass eine Reduktion des proapoptotischen BIM das Überleben von eosinophilen Granulozyten kontrolliert [107]. Konkret wurde dabei in dieser Publikation gezeigt, dass die *long non-coding* RNA Morrbid die Transkription des proapoptotischen Gens BCL2L11, das für BIM kodiert, in gegengesetzter Richtung reguliert und dass Morrbid bei Patient*innen mit Hypereosinophilie signifikant hochreguliert ist. Dieser Mechanismus wurde hier als Grundlage für die Umgehung von Apoptose gewertet. Ziel dieser Dissertation war es, eosinophile Granulozyten von Patient*innen mit Hypereosinophilie mit Eosinophilen von gesunden Spender*innen hinsichtlich ihres Apoptoseverhaltens zu untersuchen. Dabei wurden vor allem die Expressionslevel zentraler BCL-2-Proteine direkt miteinander verglichen und das Verhalten auf Apoptoseinduktion mittels BH3-Mimetika *in vitro* analysiert. Zudem wurden myeloide Progenitorzellen aus Patientenmaterial und aus gesundem Spendermaterial auf ihr *in vitro* Ansprechen auf ebendiese zielgerichtete Therapie untersucht.

Im Rahmen dieser Dissertation konnten qualitative und quantitative Unterschiede zwischen eosinophilen Granulozyten von gesunden Kontrollproband*innen und von Patient*innen mit Hypereosinophilie hinsichtlich ihres apoptotischen Verhaltens festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass es in aberranten eosinophilen Granulozyten von Patient*innen mit Hypereosinophilie zu einem fast vollständigen Verlust des proapoptotischen PUMA kommt (siehe **Abbildung 10c**). Diese Daten sind ein eindeutiger Hinweis darauf, dass in aberranten eosinophilen Granulozyten Abnormalitäten im PUMA- und/oder p53-abhängigen Apoptosemechanismus bestehen und zur Pathologie der Hypereosinophilie beitragen könnten, ähnlich wie bereits zuvor für andere hämatologische Neoplasien beschrieben [117]. Dieser Befund bestärkt die Hypothese, dass Hypereosinophilie im peripheren Blut nicht nur auf eine höhere Proliferationsrate der

eosinophilen Granulozyten im Knochenmark zurückzuführen ist, sondern auch auf eine Apoptoseresistenz in der Peripherie.

Die initial vermutete Dysregulation von BIM [107] konnte nicht nachvollzogen werden. Die Daten, die im Rahmen dieser Doktorarbeit in einem erweiterten Proband*innenkollektiv mit den identischen Primern erhoben wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied in den Genexpressionsleveln von Morrbid und BIM zwischen Patient*innen mit Hypereosinophilie und gesunden Kontrollproband*innen (siehe **Abbildung 8**). Im Studienkollektiv dieser Dissertation zeigten lediglich zwei Proband*innen die zuvor erwartete Morrbid-Erhöhung. Die Diskrepanz zu den initial veröffentlichten humanen Daten von Kotzin et al. [107] ist letztendlich nicht vollständig geklärt, da die Originalprimer übernommen wurden und technische Fehler ausgeschlossen wurden. Vergleichende Proteinmessungen und weitere Patientendaten (z.B. Vortherapie) wurden von Kotzin et al. nicht publiziert. In der weiteren Detailanalyse fällt auf, dass in der gesunden Kontrollgruppe in der vorliegenden Arbeit eine deutlich breitere Streuung der Genexpressionswerte als in der Originalarbeit zu finden ist. Die Kohorten der vorliegenden Arbeit und der Vorpublikation sind zudem nur eingeschränkt vergleichbar, zumal in der Originalarbeit auf eine Einteilung der Eosinophilien nach der WHO verzichtet wurde und im Rahmen dieser Arbeit keine Patient*innen mit infektiöser/parasitärer Eosinophilie untersucht wurden. Eine Analyse auf Mutationen in den Genen TET2 und FLT3^{ITD} (FLT3: engl. *fms like tyrosine kinase 3*; ITD: engl. *internal tandem duplication*), die bei myeloischen Neoplasien mit einer Erhöhung von Morrbid einhergehen [108], waren nicht bei allen Proband*innen Teil der klinischen Routinediagnostik. Eine Panel-Sequenzierung wichtiger Gene, die mit myeloischen Neoplasien assoziiert sind, ist nicht in allen Fällen klinisch etablierter Standard. Eine detailliertere molekulargenetische Charakterisierung beider Patientenkohorten wäre nötig, um diese gegensätzlichen Datensätze weiter in einen Kontext stellen zu können.

Die Datenlage zum Überleben gesunder eosinophiler Granulozyten als Reaktion auf BH3-Mimetika ist begrenzt (siehe **Kapitel 1.2.4**). Das Konzept der pharmakologischen Apoptoseinduktion als Therapiestrategie bei Hypereosinophilie wurde zuvor nicht getestet. In den Experimenten im Rahmen dieser Dissertation zeigten sich aberrante eosinophile Granulozyten aus dem peripheren Blut resistenter gegenüber der Apoptoseinduktion als die gesunden Eosinophilen (siehe **Abbildung 13**). Speziell das bereits in der Klinik verwendete Venetoclax (ABT-199) konnte keine Apoptose in Eosinophilen von Patient*innen mit Hypereosinophilie induzieren (siehe **Abbildung 13a**), dies stand im Einklang mit der niedrigen BCL-2 Genexpression (siehe **Abbildung 11a**). Auch dies deutet wiederum darauf hin, dass ein antiapoptotisches Priming als Teil der Erkrankung

angenommen werden kann. Hypereosinophilie könnte durch eine Apoptoseresistenz in der Peripherie getrieben sein, wahrscheinlich in Verbindung mit einer erhöhten Eosinophilenproliferationsrate im Knochenmark. Interessanterweise zeigten sich vor allem isolierte eosinophile Granulozyten von Patient*innen mit EGPA als besonders resistent gegenüber der pan-BCL-2-Blockade mittels ABT-737 (siehe **Abbildung 14a**). Hier könnten die Daten vor allem durch die andere Pathophysiologie der Autoimmunerkrankung mit unspezifischer Aktivierung einer TH-2-Zellpopulation und Freisetzung zahlreicher inflammatorischer und eosinophilotroper (Co-)Faktoren wie z.B. IL5, Interleukin 25, Interleukin 13, Interleukin 9, Interleukin 4, CD69 und CD95 erklärt werden [118]. Für die L-HES, deren Pathomechanismus ebenfalls auf Zytokinfreisetzung (IL5) durch einen allerdings genetisch aberranten T-Zellklon beruht, konnten im Rahmen dieser Arbeit hingegen keine signifikanten Unterschiede bei Zelltodinduktion mit BH3-Mimetika detektiert werden. Interessanterweise konnte aber diagnoseübergreifend eine heterogene Subkohorte an Patient*innen identifiziert werden, die sehr stark auf MCL1-Blockade mittels 1µM S63845 reagierte (siehe **Abbildung 14b**). Ein Biomarker für das Ansprechen der Eosinophilen konnte leider nicht ermittelt werden. Insgesamt ist als bemerkenswert zu nennen, dass das Therapieansprechen der eosinophilen Granulozyten auf alle verwendeten BH3-Mimetika *in vitro* nicht mit der Vortherapie der Patient*innen, der klinischen Manifestation und der absoluten Eosinophilenzahl bei Diagnose und Probenentnahme korrelierten. Zudem konnten explizit keine Korrelationen zum IL5-Plasmaspiegel zum Zeitpunkt der Probeentnahme (siehe **Abbildung 12**) ermittelt werden.

In den Experimenten an CD34⁺/CD45^{dim} myeloischen Vorläuferzellen zeigte sich die gesunde Kontrollkohorte in ihrer Viabilität unbeeinflusst von der BCL-2-Inhibition mit BH3-Mimetika. Das Ansprechen auf die *in vitro* Behandlung variierte jedoch sehr stark bei Patient*innen mit Hypereosinophilie. Auch hier konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem peripheren Blut vor allem der MCL1-Inhibitor S63845 eine hohe kurz- und langfristige Wirksamkeit auf das Stamm- und Vorläuferzellkompartiment von Patient*innen mit Hypereosinophilie nachweisen (siehe **Abbildung 16** und **Abbildung 18**), insbesondere bei monoklonaler Eosinophilie (CEL-NOS und MLN-Eo; siehe **Abbildung 17**).

Der Verlust von PUMA in eosinophilen Granulozyten und das Ansprechen des MCL1-Inhibitors S63845, insbesondere in den myeloischen Vorläuferzellen, zeigt deutlich, dass bei Erkrankungen mit Hypereosinophilie Veränderungen in der Apoptosemaschinerie vorliegen und therapeutisch genutzt werden können. Tatsächlich wird die MCL1-Blockade derzeit in frühen klinischen Studien für hämatologische Neoplasien getestet (siehe **Kapitel 1.2.3**). MCL1 könnte für Patient*innen mit Hypereosinophilie ein

vielversprechendes therapeutisches molekulares Target darstellen, insbesondere bei myeloproliferativer Eosinophilie.

In Zukunft werden weitere Studien erforderlich sein, um die Ergebnisse dieser Dissertation zu bestätigen und um die prognostische Bedeutung der Apoptoseinduktion bei Hypereosinophilie zu bewerten. Auch wenn in Vorversuchen eine direkte Korrelation zwischen BCL-2-Genexpression und Proteinlevel nachgewiesen werden konnte, sollte vor allem eine Analyse der BCL-2-Proteine auf Proteinlevel Teil dieser Untersuchungen werden. Zudem sollten weitere Analysen zur *in vivo* Toxizität der MCL1-Inhibition und die therapeutischen Auswirkungen auf die klinische Realität bei Hypereosinophilie durchgeführt werden. Die Ergebnisse der aktuell noch laufenden klinischen Phase-I-Studien zum Einsatz des MCL1-Inhibitors S64315 bei AML oder MDS (clinicaltrials.gov, NCT02979366, NCT03672695, NCT04629443) werden zeitnah erste Toxizitätsdaten liefern.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine erste Grundlage für einen neuen therapeutischen Ansatz bei Hypereosinophilie und hypereosinophilieassoziierten Erkrankungen gelegt werden.

5. Zusammenfassung

Hypereosinophilie und hypereosinophilieassoziierte Erkrankungen sind eine heterogene Gruppe von schweren Erkrankungen, die durch eine erhöhte Anzahl eosinophiler Granulozyten im peripheren Blut, Knochenmark oder Gewebe gekennzeichnet sind. Die Behandlungsmöglichkeiten für Hypereosinophilie sind trotz neuerer therapeutischer Ansätze wie beispielsweise IL5-gerichtete monoklonale Antikörper und Tyrosinkinase-Inhibitoren begrenzt. Die Bedeutung fehlgesteuerter Apoptose in eosinophilen Granulozyten ist nicht vollständig geklärt. Es ist insbesondere unklar, ob deregulierte Apoptose ein kritischer Faktor bei hypereosinophilen Erkrankungen ist, der durch BH3-Mimetika wie beispielsweise Venetoclax gezielt therapiert werden könnte.

Um abweichende Apoptosemuster eosinophiler Granulozyten und die Möglichkeiten einer pharmakologischen Intervention mit BH3-Mimetika zu verstehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Genexpressionslevel zentraler BCL-2 Proteine in eosinophilen Granulozyten in Patientenmaterial gemessen. Zudem wurde die Potenz einer pharmakologischen BCL-2-Proteininhibition an primären Patientenproben (Blut und Knochenmark) aus verschiedenen Subtypen der Hypereosinophilie (HES n=18, CEL-NOS n=9, L-HES n=2, MLN-Eo n=2, EGPA n=11, reaktive Eosinophilie n=3) analysiert.

Überraschenderweise unterschieden sich die Genexpressionslevel der langen *long non-coding RNA Morrbid* und des proapoptotischen BIM nicht zwischen Eosinophilen gesunder Spender*innen und Patient*innen mit Hypereosinophilie. Stattdessen zeigten eosinophile Granulozyten aus Patientenmaterial einen vollständigen Verlust des proapoptotischen PUMA im Vergleich zur gesunden Kontrollkohorte. Das antiapoptotische BCL-2 war in Eosinophilen aus Patientenproben signifikant herunterreguliert. Dementsprechend konnte die BCL-2-Inhibition mit Venetoclax keine Zelltodinduktion in eosinophilen Granulozyten von Patient*innen mit Hypereosinophilie erreichen. Allerdings verringerte die MCL1-Inhibition mit S63845 spezifisch die Viabilität von Vorläuferzellen des Knochenmarks bei Patient*innen mit Hypereosinophilie - in Patientenproben von Patient*innen mit chronischer eosinophiler Leukämie (CEL-NOS) oder myeloischer und lymphatischer Neoplasie mit Hypereosinophilie (MLN-Eo) war die Zelltodinduktion besonders stark. MCL1 könnte ein vielversprechendes therapeutisches Ziel für Patient*innen mit Hypereosinophilie darstellen, insbesondere für die myeloproliferativen Formen. Teile der vorliegenden Arbeit wurden vom Verfasser dieser Dissertation bereits als Erstautor im *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* publiziert [110].

Literaturverzeichnis

1. Radonjic-Hosli, S. and H.U. Simon, *Eosinophils*. Chem Immunol Allergy, 2014. **100**: p. 193-204.
2. Lee, J.J., et al., *Eosinophils in health and disease: the LIAR hypothesis*. Clin Exp Allergy, 2010. **40**(4): p. 563-75.
3. Bochner, B.S., *The Eosinophil: for better or worse, in sickness and in health*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2018.
4. O'Sullivan, J.A. and B.S. Bochner, *Eosinophils and eosinophil-associated diseases: An update*. J Allergy Clin Immunol, 2018. **141**(2): p. 505-517.
5. Shomali, W. and J. Gotlib, *World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and management*. Am J Hematol, 2019. **94**(10): p. 1149-1167.
6. Furuta, S., T. Iwamoto, and H. Nakajima, *Update on eosinophilic granulomatosis with polyangiitis*. Allergol Int, 2019. **68**(4): p. 430-436.
7. Simon, D., A. Wardlaw, and M.E. Rothenberg, *Organ-specific eosinophilic disorders of the skin, lung, and gastrointestinal tract*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010. **126**(1): p. 3-13.
8. Mankad, R., C. Bonnicksen, and S. Mankad, *Hypereosinophilic syndrome: cardiac diagnosis and management*. Heart, 2016. **102**(2): p. 100-6.
9. Nanagas, V.C. and A. Kovalszki, *Gastrointestinal Manifestations of Hypereosinophilic Syndromes and Mast Cell Disorders: a Comprehensive Review*. Clin Rev Allergy Immunol, 2018.
10. Ramzan, M., et al., *Isolated bilateral uveitis in child with hypereosinophilic syndrome*. J Pediatr Hematol Oncol, 2014. **36**(7): p. e465-7.
11. Tohge, R., et al., *Two cases of acute myelitis with idiopathic hypereosinophilic syndrome*. BMJ Case Rep, 2014. **2014**.
12. Wang, L., et al., *Idiopathic hypereosinophilic syndrome revealed by encephalopathy*. J Clin Neurosci, 2012. **19**(12): p. 1746-8.
13. Litvinova, L.S., et al., *Cytokine mediated apoptosis of granulocyte eosinophils in expressed blood eosiniphilia*. Cell and Tissue Biology, 2008. **2**(1): p. 33-37.
14. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
15. Jilg, S., et al., *Blockade of BCL-2 proteins efficiently induces apoptosis in progenitor cells of high-risk myelodysplastic syndromes patients*. Leukemia, 2016. **30**(1): p. 112-23.
16. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 47-59.
17. Fernández-Marrero, Y., et al., *Survival control of malignant lymphocytes by anti-apoptotic MCL-1*. Leukemia, 2016. **30**(11): p. 2152-2159.
18. Merino, D., et al., *BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines*. Cancer Cell, 2018. **34**(6): p. 879-891.
19. Kotschy, A., et al., *The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models*. Nature, 2016. **538**(7626): p. 477-482.
20. Bessou, M., et al., *The apoptosis inhibitor Bcl-xL controls breast cancer cell migration through mitochondria-dependent reactive oxygen species production*. Oncogene, 2020. **39**(15): p. 3056-3074.
21. Rothenberg, M.E., *Eosinophilia*. N Engl J Med, 1998. **338**(22): p. 1592-600.
22. Valent, P., et al., *Contemporary consensus proposal on criteria and classification of eosinophilic disorders and related syndromes*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(3): p. 607-612 e9.
23. Crane, M.M., et al., *Incidence of myeloproliferative hypereosinophilic syndrome in the United States and an estimate of all hypereosinophilic syndrome incidence*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(1): p. 179-81.

24. Wynn, S.R., et al., *Idiopathic hypereosinophilic syndrome in a 5 1/2-month-old infant*. J Pediatr, 1987. **111**(1): p. 94-7.
25. Rives, S., et al., *Idiopathic hypereosinophilic syndrome in children: report of a 7-year-old boy with FIP1L1-PDGFR α rearrangement*. J Pediatr Hematol Oncol, 2005. **27**(12): p. 663-5.
26. Gotlib, J. and J. Cools, *Five years since the discovery of FIP1L1-PDGFR α : what we have learned about the fusion and other molecularly defined eosinophilias*. Leukemia, 2008. **22**(11): p. 1999-2010.
27. Metzgeroth, G., et al. *Myeloische Neoplasien mit Eosinophilie (früher: Eosinophilie - assoziierte Myeloproliferative Erkrankungen (MPN-Eo))*. 2020 November [cited 2021 01.03.]; DGHO Leitlinie]. Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/myeloische-neoplasien-mit-eosinophilie-frueher-eosinophilie-assoziierte-myeloproliferative-erkrankungen-mpn-eo/@@guideline/html/index.html>.
28. Pardanani, A., et al., *FIP1L1-PDGFR α fusion: prevalence and clinicopathologic correlates in 89 consecutive patients with moderate to severe eosinophilia*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3038-45.
29. Kahn, J.E., M. Groh, and G. Lefevre, *(A Critical Appraisal of) Classification of Hypereosinophilic Disorders*. Front Med (Lausanne), 2017. **4**: p. 216.
30. Weller, P.F. and G.J. Bubley, *The idiopathic hypereosinophilic syndrome*. Blood, 1994. **83**(10): p. 2759-79.
31. Gotlib, J., et al., *The FIP1L1-PDGFR α fusion tyrosine kinase in hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia: implications for diagnosis, classification, and management*. Blood, 2004. **103**(8): p. 2879-91.
32. Henes, J.C., S. Wirths, and B. Hellmich, *[Differential diagnosis of hypereosinophilia]*. Z Rheumatol, 2019.
33. Hoffman, R., et al., *Hematology: basic principles and practice*. 2013: Elsevier Health Sciences.
34. Bain, B., et al., *Myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of PDGFRA, PDGFRB or FGFR1 In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al.(eds). Lyon, France: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 2008, IARC Press.
35. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. Blood, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
36. Andres, E., et al., *The pathophysiology of elevated vitamin B12 in clinical practice*. QJM, 2013. **106**(6): p. 505-15.
37. Cools, J., et al., *A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome*. N Engl J Med, 2003. **348**(13): p. 1201-14.
38. Metzgeroth, G., et al., *Recurrent finding of the FIP1L1-PDGFR α fusion gene in eosinophilia-associated acute myeloid leukemia and lymphoblastic T-cell lymphoma*. Leukemia, 2007. **21**(6): p. 1183-8.
39. Reiter, A. and J. Gotlib, *Myeloid neoplasms with eosinophilia*. Blood, 2017. **129**(6): p. 704-714.
40. Elling, C., et al., *Novel imatinib-sensitive PDGFRA-activating point mutations in hypereosinophilic syndrome induce growth factor independence and leukemia-like disease*. Blood, 2011. **117**(10): p. 2935-43.
41. Klion, A.D., et al., *Elevated serum tryptase levels identify a subset of patients with a myeloproliferative variant of idiopathic hypereosinophilic syndrome associated with tissue fibrosis, poor prognosis, and imatinib responsiveness*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4660-6.

42. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405. **128**(3): p. 462-463.
43. Jawhar, M., et al., *Imatinib in myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia and rearrangement of PDGFRB in chronic or blast phase*. *Ann Hematol*, 2017. **96**(9): p. 1463-1470.
44. Jawhar, M., et al., *Cytogenetically cryptic ZMYM2-FLT3 and DIAPH1-PDGFRB gene fusions in myeloid neoplasms with eosinophilia*. *Leukemia*, 2017. **31**(10): p. 2271-2273.
45. Greipp, P.T., G.W. Dewald, and A. Tefferi, *Prevalence, breakpoint distribution, and clinical correlates of t(5;12)*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004. **153**(2): p. 170-2.
46. Macdonald, D., A. Reiter, and N.C. Cross, *The 8p11 myeloproliferative syndrome: a distinct clinical entity caused by constitutive activation of FGFR1*. *Acta Haematol*, 2002. **107**(2): p. 101-7.
47. Chase, A., et al., *Ponatinib as targeted therapy for FGFR1 fusions associated with the 8p11 myeloproliferative syndrome*. *Haematologica*, 2013. **98**(1): p. 103-6.
48. Verstovsek, S., et al., *Interim results from Fight-203, a phase 2, open-label, multicenter study evaluating the efficacy and safety of pemigatinib (INCB054828) in patients with myeloid/lymphoid neoplasms with rearrangement of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)*. *Blood*, 2018. **132**(Supplement 1): p. 690-690.
49. Rumi, E., et al., *Efficacy of ruxolitinib in myeloid neoplasms with PCM1-JAK2 fusion gene*. *Ann Hematol*, 2015. **94**(11): p. 1927-8.
50. Schwaab, J., et al., *Limited duration of complete remission on ruxolitinib in myeloid neoplasms with PCM1-JAK2 and BCR-JAK2 fusion genes*. *Ann Hematol*, 2015. **94**(2): p. 233-8.
51. Helbig, G., et al., *Chronic eosinophilic leukemia-not otherwise specified has a poor prognosis with unresponsiveness to conventional treatment and high risk of acute transformation*. *Am J Hematol*, 2012. **87**(6): p. 643-5.
52. Stella, S., et al., *Molecular Pathogenesis and Treatment Perspectives for Hypereosinophilia and Hypereosinophilic Syndromes*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(2).
53. Lefevre, G., et al., *The lymphoid variant of hypereosinophilic syndrome: study of 21 patients with CD3-CD4+ aberrant T-cell phenotype*. *Medicine (Baltimore)*, 2014. **93**(17): p. 255-266.
54. Simon, H.U., et al., *Expansion of cytokine-producing CD4-CD8- T cells associated with abnormal Fas expression and hypereosinophilia*. *J Exp Med*, 1996. **183**(3): p. 1071-82.
55. Simon, H.U., et al., *Abnormal clones of T cells producing interleukin-5 in idiopathic eosinophilia*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(15): p. 1112-20.
56. Schwaab, J., et al., *KIT D816V and JAK2 V617F mutations are seen recurrently in hypereosinophilia of unknown significance*. *Am J Hematol*, 2015. **90**(9): p. 774-7.
57. Wang, S.A., et al., *Targeted next-generation sequencing identifies a subset of idiopathic hypereosinophilic syndrome with features similar to chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified*. *Mod Pathol*, 2016. **29**(8): p. 854-64.
58. FDA. *FDA Approves First Drug to Treat Group of Rare Blood Disorders in Nearly 14 Years*. 2020 [cited 2021 03.03.]; Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-treat-group-rare-blood-disorders-nearly-14-years>.
59. Rothenberg, M.E., et al., *Treatment of patients with the hypereosinophilic syndrome with mepolizumab*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(12): p. 1215-28.
60. GSK. *GSK Nucala (mepolizumab) filings accepted by European Medicines Agency for three additional eosinophil-driven diseases*. 2020 29.10.2020 [cited 2021 03.03.]; Available from: <https://www.gsk.com/en-gb/media/press-releases/gsk-nucala-mepolizumab-filings-accepted-by-european-medicines-agency-for-three-additional-eosinophil-driven-diseases/>.

61. Kuang, F.L., et al., *Benralizumab for PDGFRA-Negative Hypereosinophilic Syndrome*. N Engl J Med, 2019. **380**(14): p. 1336-1346.
62. Jennette, J.C., et al., *2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(1): p. 1-11.
63. Sable-Fourtassou, R., et al., *Antineutrophil cytoplasmic antibodies and the Churg-Strauss syndrome*. Ann Intern Med, 2005. **143**(9): p. 632-8.
64. Schirmer, J.H. and B.F. Hoyer, *[Hypereosinophilic syndrome and other rheumatic diseases with hypereosinophilia]*. Z Rheumatol, 2019. **78**(4): p. 322-332.
65. Comarmond, C., et al., *Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg-Strauss): clinical characteristics and long-term followup of the 383 patients enrolled in the French Vasculitis Study Group cohort*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(1): p. 270-81.
66. Puechal, X., et al., *Adding Azathioprine to Remission-Induction Glucocorticoids for Eosinophilic Granulomatosis With Polyangiitis (Churg-Strauss), Microscopic Polyangiitis, or Polyarteritis Nodosa Without Poor Prognosis Factors: A Randomized, Controlled Trial*. Arthritis Rheumatol, 2017. **69**(11): p. 2175-2186.
67. Wechsler, M.E., et al., *Mepolizumab or Placebo for Eosinophilic Granulomatosis with Polyangiitis*. N Engl J Med, 2017. **376**(20): p. 1921-1932.
68. Pagnoux, C., et al., *Serum cytokine and chemokine levels in patients with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, hypereosinophilic syndrome, or eosinophilic asthma*. Clin Exp Rheumatol, 2019.
69. Khoury, P., et al., *Serum biomarkers are similar in Churg-Strauss syndrome and hypereosinophilic syndrome*. Allergy, 2012. **67**(9): p. 1149-56.
70. Schirmer, J.H., et al., *[S1 guidelines Diagnostics and treatment of ANCA-associated vasculitis]*. Z Rheumatol, 2017. **76**(Suppl 3): p. 77-104.
71. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. Cell Death Differ, 2018. **25**(3): p. 486-541.
72. Hotchkiss, R.S., et al., *Cell death*. N Engl J Med, 2009. **361**(16): p. 1570-83.
73. Czabotar, P.E., et al., *Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(1): p. 49-63.
74. Zustakova, M., L. Kratochvilova, and P. Slama, *Apoptosis of Eosinophil Granulocytes*. Biology (Basel), 2020. **9**(12).
75. D'Arcy, M.S., *Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy*. Cell Biol Int, 2019. **43**(6): p. 582-592.
76. Bossen, C., et al., *Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 13964-71.
77. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. Oncogene, 2007. **26**(9): p. 1324-37.
78. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 647-56.
79. Kaufmann, S., W. Meng, and H. Dai, *BCL2 Family, Mitochondrial Apoptosis, and Beyond*. Cancer Translational Medicine, 2016. **2**(1).
80. Perini, G.F., et al., *BCL-2 as therapeutic target for hematological malignancies*. J Hematol Oncol, 2018. **11**(1): p. 65.
81. Munkhbaatar, E., et al., *MCL-1 gains occur with high frequency in lung adenocarcinoma and can be targeted therapeutically*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 4527.
82. Huang, J., W. Fairbrother, and J.C. Reed, *Therapeutic targeting of Bcl-2 family for treatment of B-cell malignancies*. Expert Rev Hematol, 2015. **8**(3): p. 283-97.
83. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13944-9.
84. Green, D.R. and H. Walczak, *Apoptosis therapy: driving cancers down the road to ruin*. Nat Med, 2013. **19**(2): p. 131-3.
85. Pedley, R. and A.P. Gilmore, *Mitosis and mitochondrial priming for apoptosis*. Biol Chem, 2016. **397**(7): p. 595-605.

86. Ni Chonghaile, T., et al., *Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy*. *Science*, 2011. **334**(6059): p. 1129-33.
87. Oltersdorf, T., et al., *An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours*. *Nature*, 2005. **435**(7042): p. 677-81.
88. Chauhan, D., et al., *A novel Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma*. *Oncogene*, 2007. **26**(16): p. 2374-80.
89. Konopleva, M., et al., *Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia*. *Cancer Cell*, 2006. **10**(5): p. 375-88.
90. van Delft, M.F., et al., *The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized*. *Cancer Cell*, 2006. **10**(5): p. 389-99.
91. Tse, C., et al., *ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor*. *Cancer Res*, 2008. **68**(9): p. 3421-8.
92. Wilson, W.H., et al., *Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(12): p. 1149-59.
93. Petros, A.M., et al., *Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(6): p. 3012-7.
94. Souers, A.J., et al., *ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets*. *Nat Med*, 2013. **19**(2): p. 202-8.
95. Khaw, S.L., et al., *Both leukaemic and normal peripheral B lymphoid cells are highly sensitive to the selective pharmacological inhibition of prosurvival Bcl-2 with ABT-199*. *Leukemia*, 2014. **28**(6): p. 1207-15.
96. Roberts, A.W., et al., *Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia*. *N Engl J Med*, 2016. **374**(4): p. 311-22.
97. Röllig, C., *Akute myeloische Leukämie: Therapie im Wandel*. *Dtsch Arztebl International*, 2020. **117**.
98. Akgul, C., *Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(8): p. 1326-36.
99. Wong, K.Y. and C.S. Chim, *Venetoclax, bortezomib and S63845, an MCL1 inhibitor, in multiple myeloma*. *J Pharm Pharmacol*, 2020. **72**(5): p. 728-737.
100. Szlavik, Z., et al., *Discovery of S64315, a Potent and Selective Mcl-1 Inhibitor*. *J Med Chem*, 2020. **63**(22): p. 13762-13795.
101. Lessene, G., et al., *Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor*. *Nat Chem Biol*, 2013. **9**(6): p. 390-7.
102. Rothenberg, M.E. and S.P. Hogan, *The eosinophil*. *Annu Rev Immunol*, 2006. **24**: p. 147-74.
103. Schwartz, C., et al., *Eosinophil-specific deletion of IkappaBalpha in mice reveals a critical role of NF-kappaB-induced Bcl-xL for inhibition of apoptosis*. *Blood*, 2015. **125**(25): p. 3896-904.
104. Röhner, L., et al., *Impact of BH3-mimetics on Human and Mouse Blood Leukocytes: A Comparative Study*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 222.
105. Dibbert, B., et al., *Role for Bcl-xL in delayed eosinophil apoptosis mediated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5*. *Blood*, 1998. **92**(3): p. 778-83.
106. Park, Y.M. and B.S. Bochner, *Eosinophil survival and apoptosis in health and disease*. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2010. **2**(2): p. 87-101.
107. Kotzin, J.J., et al., *The long non-coding RNA Morrbid regulates Bim and short-lived myeloid cell lifespan*. *Nature*, 2016. **537**(7619): p. 239-243.
108. Cai, Z., et al., *Targeting Bim via a lncRNA Morrbid Regulates the Survival of Preleukemic and Leukemic Cells*. *Cell Rep*, 2020. **31**(12): p. 107816.
109. Jilg, S., et al., *BCL-2 family proteins as distinctive regulators of aberrant eosinophils*. *Oncology Research and Treatment*, 2019. **42**: p. 70-71.

110. Odinius, T.O., et al., *Comprehensive characterization of central BCL-2 family members in aberrant eosinophils and their impact on therapeutic strategies*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2021.
111. Zerbino, D.R., et al., *Ensembl 2018*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D754-D761.
112. Untergasser, A., et al., *Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Web Server issue): p. W71-4.
113. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
114. Dewson, G., G.M. Cohen, and A.J. Wardlaw, *Interleukin-5 inhibits translocation of Bax to the mitochondria, cytochrome c release, and activation of caspases in human eosinophils*. Blood, 2001. **98**(7): p. 2239-47.
115. Dewson, G., G.M. Walsh, and A.J. Wardlaw, *Expression of Bcl-2 and its homologues in human eosinophils. Modulation by interleukin-5*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(4): p. 720-8.
116. Jilg, S., et al., *Venetoclax with azacitidine targets refractory MDS but spares healthy hematopoiesis at tailored dose*. Exp Hematol Oncol, 2019. **8**: p. 9.
117. Guirguis, A.A., et al., *PUMA promotes apoptosis of hematopoietic progenitors driving leukemic progression in a mouse model of myelodysplasia*. Cell Death Differ, 2016. **23**(6): p. 1049-59.
118. Fagni, F., F. Bello, and G. Emmi, *Eosinophilic Granulomatosis With Polyangiitis: Dissecting the Pathophysiology*. Front Med (Lausanne), 2021. **8**: p. 627776.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Differenzialdiagnostik und Subklassifikation der myeloischen Neoplasien mit Eosinophilie (DGHO Leitlinie 2020)	12
Abbildung 2: Diagnosealgorhythmus des WHO Updates 2019 von Shomali et al.....	13
Abbildung 3: Übersicht über die Familie der BCL-2-Proteine und ihre Domänen, modifiziert nach Kaufmann et al.....	22
Abbildung 4: Die wichtigsten proapoptotischen und überlebensfördernden Proteine in der Übersicht, modifiziert nach Adams and Cory.....	24
Abbildung 5: Die wichtigsten BH3-Mimetika und ihre Interaktion mit den wichtigsten proapoptotischen und überlebensfördernden BCL-2-Proteine in der Übersicht, modifiziert nach Adams and Cory	28
Abbildung 6: Flowchart Probenverarbeitung.....	45
Abbildung 7: Beispielhaftes Gating der durchflusszytometrischen Viabilitätsanalyse ..	51
Abbildung 8: Genexpression von BIM und MORRBID in primären humanen eosinophilen Granulozyten	53
Abbildung 9: MORRBID und BIM Genexpression korreliert nicht mit den Interleukin-5 Plasmaspiegel im Patientenblut.....	54
Abbildung 10: Genexpression der wichtigsten proapoptotischen BCL-2 Proteine in primären humanen eosinophilen Granulozyten	55
Abbildung 11: Genexpression der wichtigsten antiapoptotischen BCL-2 Proteine in primären humanen eosinophilen Granulozyten	57
Abbildung 12: Das Ansprechen der eosinophilen Granulozyten auf <i>in vitro</i> Behandlung mit BH3-Mimetika korreliert nicht mit dem Interleukin-5 Plasmaspiegel im Patient*innenblut.....	59
Abbildung 13: Aberrante eosinophile Granulozyten von Patient*innen mit Hypereosinophilie sind resistenter gegenüber einer Apoptoseinduktion mit BH3-Mimetika im Vergleich zu gesunden Kontrollen	60
Abbildung 14: Aberrante Eosinophile von Patient*innen mit EGPA sind besonders resistent gegenüber Apoptoseinduktion mittels ABT-737, die Effekte der Apoptoseinduktion durch den MCL1-Inhibitor S63845 sind sehr variabel in eosinophilen Granulozyten.....	61

Abbildung 15: Erhöhte BCL-2-Genexpression geht mit einem erhöhten Ansprechen auf BCL-2 Inhibition einher	62
Abbildung 16: MCL1-Inhibition mit S63845 reduziert die Viabilität in primären myeloischen Vorläuferzelle.	63
Abbildung 17: MCL1-Inhibition mit S63845 reduziert die Viabilität vor allem in primären myeloischen Vorläuferzellen in Patientenproben mit Eosinophilie monoklonalen Ursprung	64
Abbildung 18: MCL1-Inhibition mit S63845 zeigt eine Langzeitwirkung auf myeloische Vorläuferzellen von Patient*innen mit Hypereosinophilie im Methylcellulose-Test.....	64

Abkürzungsverzeichnis

7

7AAD - 7-amino-actinomycin D

A

ABL - abelson kinase

AEC - absolute eosinophile count

AML - Akute Myeloische Leukämie

ANCA - anti-neutrophilic cytoplasmatic antibody

APAF-1 - apoptotic protease activating factor 1

APC - allophycocyanin

ARDS - acute respiratory distress syndrome

ASXL1 - putative polycomb group protein ASXL1

B

BAD - BCL-2 antagonist of cell death

BAK - BCL-2 antagonist/killer

BAX - BCL-2-associated X protein

BCL-2 - B-cell lymphoma 2

BCL-B - BCL-2-like protein 10

BCL-w - BCL-2-like protein 2

BCL-xL - B-cell lymphoma extra-large

BCR - breakpoint cluster region

BFU-E - burst forming unit - erythrocyte

BH - BCL-2-homology

BH3 - BCL-2 homology domain

BID - BH3 interacting-domain death agonist

BIK - BCL-2-interacting killer

BIM - BCL-2-interacting mediator of cell death

BIT - bovine serum albumin/insulin/transferrin

BMF - BCL-2-modifying factor

BMMC - bone marrow mononuclear cells

BOK - BCL-2-related ovarian killer protein

C

CBL - casitas b-lineage lymphoma

CCDC88C - coiled-coil domain containing 88C

CD - cluster of differentiation

CD16 - cluster of differentiation 16 (FcγRIII Rezeptor)

CD34 - Hämatopoetisches Vorläuferzellantigen CD34
CD45 - cluster of differentiation 45 (Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C)
CDK5RAP1 - CDK5 regulatory subunit-associated protein 1
cDNS - Komplementäre DNS
CEL-NOS - Chronische Eosinophilenleukämie, nicht genauer spezifiziert
CFU-GEMM - colony forming unit - granulocyte, erythrocyte, macrophage, megacaryocyte
CFU-GM - colony forming unit - granulocyte macrophag
CHIC2 - cysteine-rich hydrophobic domain-containing protein 2
CLL - Chronisch Lymphatische Leukämie
CML - Chronisch Myeloische Leukämie
CMML - Chronisch Myelomonozytäre Leukämie

D

DED - death-inducing domain
DGHO - Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie
Diff-BB - Differenzialblutbild
DISC - death-inducing signal complex
DMSO - Dimethyl sulfoxid
DPBS - Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

E

EGPA - Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis
ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay
EMA - European Medicine Agency
engl. - englisch
EoM - Eosinophilen Medium
ETV6 - ETS variant transcription factor 6
EZH2 - enhancer of zeste homolog 2

F

FAB - French-American-British
FACS - fluorescence activated cell sorting
FADD - FAS-associated death domain
FBS - fetal bovine serum
FcR - Fc-Rezeptor
FDA - U.S. Food and Drug Administration
FGFR1 - fibroblast growth factor receptor 1
FIP1L1 - factor interacting with PAPOLA and CPSF1
FISH - Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FLT3 - fms like tyrosine kinase 3

G

GM-CSF - Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor

H

HEPES - 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure

HES - Hypereosinophiles Syndrom

HE_{US} - Hypereosinophilie unklarer Signifikanz

HRK - harakiri

I

IAP - Inhibitorische Apoptoseproteine

IHC - Immunhistochemie

IL3 - Interleukin 3

IL5 - Interleukin 5

IL6 - Interleukin 6

IMDM - Iscove's Modified Dulbecco's Medium

ITD - internal tandem duplication

J

JAK2 - Januskinase 2

JMML - Juvenile Myelomonozytäre Leukämie

K

KM - Knochenmark

L

LDL - Low Density Lipoprotein

M

MACS - magnetic cell sort

MCL1 - myeloid cell leukemia 1

MDS - Myelodysplastisches Syndrom

MEM NEAA - minimal essential media non-essential amino acids

MLN-Eo - Myeloische/lymphatische Neoplasie mit klonaler Eosinophilie

MM - Multiples Myelom

MOMP - mitochondrial outer membrane permeabilization

MPN-Eo - Myeloproliferative Neoplasie mit Eosinophilie

mRNA - messenger RNA

N

NF- κ B - nuclear factor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells

NGS - Next Generation Sequencing

NHL - Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen - Natürliche Killerzellen
NOTCH1 - notch homolog 1, translocation associated
NOXA - phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1

O

OMI/HTRA2 - HtrA serine peptidase 2

P

PBMC - peripheral blood mononuclear cells
PCM1 - pericentriolar material 1
PCR - Polymerasekettenreaktion
PDGFRA - platelet-derived growth factor receptor A
PDGFRB - platelet-derived growth factor receptor B
PFA - Paraformaldehyd
PUMA - p53 upregulated modulator of apoptosis

R

RBC - red blood cell
RNA - ribonucleic acid
RNS - Ribonukleinsäure
RPMI - Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR - Echtzeit-PCR
RT-qPCR - quantitative Echtzeit-PCR

S

SCF - stem cell factor
SD - Standardabweichung
SDS - sodium dodecyl sulfate
SETBP1 - SET binding protein 1
SFM - Serumfreies Medium
Siglec - sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins
SM - Systemische Mastozytose
SMAC/DIABLO - second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low P
STAT5B - signal transducer and activator of transcription 5B

T

TAE - Tris-Azetat-EDTA-Puffer
T-ALL - T-akute lymphoblastische Leukämie
TET2 - tet methylcytosine dioxygenase 2
TKI - Tyrosinkinaseinhibitor

TM - Transmembrandomäne

TNF - Tumornekrosefaktor

TPO - Thrombopoietin

TRADD - TNF receptor associated death domain

W

WEHI - Wall and Eliza Hall Institute of Medical Research

WHO - World Health Organization

Z

ZMYM2 - zinc finger MYM-type protein 2

ZNF198 - zinc finger protein 198

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Manifestationen bei Hypereosinophilie, modifiziert und übersetzt nach Gotlib et al.	10
Tabelle 2: Erstellte Primer-Sequenzen	35
Tabelle 3: Primer-Sequenzen aus Kotzin et al.....	36
Tabelle 4: Patient*innenkollektiv und klinische Charakteristika	42
Tabelle 5: Patient*innenkollektiv nach Geschlecht und Alter.....	43
Tabelle 6: Patient*innenkollektiv nach Diagnose.	43
Tabelle 7: Klinische Manifestationen, nach Organsystem.	43
Tabelle 8: Kollektiv der gesunden Blutspender*innen	44
Tabelle 9: Kollektiv der gesunden Blutspender*innen nach Geschlecht und Alter	44
Tabelle 10: Kollektiv der gesunden Knochenmarkspender*innen	44
Tabelle 11: Kollektiv der gesunden Knochenmarkspender*innen nach Geschlecht und Alter.....	45

Danksagung

Danken möchte ich Univ.-Prof. Dr. Florian Bassermann, der es mir ermöglichte, die vorliegende Dissertation an seiner Klinik und Poliklinik für Hämatologie und Internistische Onkologie am Klinikum rechts der Isar durchzuführen. Vor allem möchte ich mich bei Prof. Dr. Philipp Jost für die Überlassung des interessanten und translationalen Themas sowie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen im Labor und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation bedanken. Bei meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. Knut Brockow und meinem Mentor PD Dr. Philipp Moog bedanke ich mich für ihr stets konstruktives Feedback und ihren fachlichen Rat. Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Betreuerin PD Dr. Stefanie Jilg bedanken, die mich permanent mit höchstem Engagement unterstützt und gefördert hat und mir jede nur erdenkliche fachliche und persönliche Unterstützung zukommen ließ. Zudem möchte ich herzlich Dr. Caterina Branca und Ulrike Höckendorf danken, die ich sowohl fachlich als auch als Kolleginnen sehr schätze und die mir stets mit Rat und technischer Hilfe zur Seite standen. Meine Vor- bzw. Mitdoktorand*innen Celina Wagner, Marta Dechant, Lars Buschhorn und Dr. Veronika Dill waren während der gesamten Zeit im Labor immer eine große Unterstützung - bei ihnen bedanke ich mich für die angenehme Zusammenarbeit und die stets großartige Atmosphäre im Team. Ein großer Dank gilt den weiteren Kolleg*innen der gesamten Arbeitsgruppe für das ausgezeichnete Arbeitsklima, das ich immer sehr geschätzt habe.

Außerdem bedanke ich mich ganz besonders bei der Fakultät für Medizin der Technischen Universität für die Aufnahme in das Promotionsprogramm „Translationale Medizin“ und das damit verbundene großzügige Promotionsstipendium der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung. Zudem möchte ich mich bei den zahlreichen Patient*innen und gesunden Proband*innen bedanken, die ihr Blut und/oder Knochenmark der Forschung spendeten und damit die Grundlage zum Gelingen dieser translationalen Doktorarbeit waren.

Des Weiteren möchte ich vor allem meinem ganzen Freundeskreis, der mich während meines gesamten Studiums und der Promotion stets moralisch unterstützt hat, großen Dank aussprechen.

Meinen Eltern, Elisabeth Müller-Odinus und Ingo Odinus, meiner Schwester Timea, meiner Großmutter Gertrud und meinem Freund Thomas gilt größter Dank dafür, dass sie mich während des gesamten Studiums und der Promotion in jeglicher Hinsicht uneingeschränkt unterstützt haben. Vielen Dank für Euren enormen Rückhalt, der als wichtiger Teil zum Erfolg meines Studiums beigetragen hat.